



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

**Desarrollo de procesos biotecnológicos para la
producción heteróloga de proteínas del virus de la
rabia para su uso en medicina veterinaria**

Leandro Daniel Picotto

Directores

Marcelo Ricardo Ítalo Pecoraro y Sebastián Fernando Cavalitto

Laboratorio de Virología (LAVIR)
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Miembros del jurado:

Dra. María E. Rodríguez Dr. Juan Claus Dr. Eduardo Mórtola

2018

DEDICATORIA

A la hora de dedicar este trabajo, se me ocurren sólo aquellas personas que han estado, están y estarán siempre junto a mí.

En primer lugar quiero agradecer a mi familia que siempre está a mi lado acompañándome. Sin su amor e incondicionalidad no hubiese sido posible desarrollarme en el ámbito de la vida.

A mis padres Susana y Daniel le dedico esta tesis, que ha sido fruto del trabajo, sacrificio, y estudio, palabras que me han inculcado desde que tengo memoria. Por enseñarme que no existe título más importante que el de buena persona.

A mis hermanos Nahuel, Andrés y Julián, y a mi hermana Manuela, por estar siempre y ser mi sostén anímico. No me imagino la vida sin ustedes.

A mis sobrinos Matilda y Fermín que le dan alegría y amor a mi vida.

A mis abuelos Lita, Titi, Luis y Alfredo por malcriarme y darme una infancia tan feliz, llena de cariño y hermosos recuerdos.

A mis amigas y amigos que algún día llegaron a mi vida y hoy son parte de mí.

AGRADECIMIENTOS

A Hernán Sguazza por acompañarme durante todo este trayecto con mucha paciencia y comprensión, brindándome su tiempo y conocimientos en todo momento. Sin su valioso aporte, este trabajo no se hubiese llevado a cabo.

A mis directores, Marcelo Pecoraro y Sebastián Cavalitto, por confiar en mí e incluirme en sus grupos de trabajo. Por sus consejos, conocimientos, y por ser ejemplos a seguir profesional y personalmente.

A Cecilia Galosi y Gabriela Echeverría por recibirme en el Laboratorio de Virología y hacerme sentir en mi lugar, brindándome su experiencia y cariño.

A mis compañeras y compañeros de Virología y del CINDEFI. Por enseñarme numerosas cosas y estar siempre para todo. Por los incontables momentos gratos compartidos y hacerme disfrutar del trabajo. Es un placer haber compartido con ustedes estos años.

A todas las personas que me crucé en el ámbito educativo y que me brindaron sus conocimientos y experiencias de vida. A todas las instituciones educativas por las que he transitado.

A CONICET, por apoyarme y permitirme trabajar en este proyecto.

A la Argentina, por otorgarme una educación pública, gratuita y de calidad, inculcándome el valor de la conciencia colectiva. Por otorgarme los medios para desarrollarme profesionalmente, sin tener que pagar un arancel, caso contrario no hubiese llegado hasta aquí.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados en:

An effective and simplified DO-stat control strategy for production of rabies glycoprotein in Pichia pastoris. Picotto L, Sguazza G, Tizzano M, Galosi C, Cavalitto S, Pecoraro M. Protein Expression and Purification. 2017;132:124-30.

Producción de la glicoproteína G del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris*, para su uso en medicina veterinaria. Picotto L, Sguazza G, Tizzano M, Cavalitto S, Pecoraro M. Analecta Veterinaria. 2015;35(2):5-11.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron presentados en:

IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SaProBio 2016). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 1-2 de Diciembre de 2016. **Producción de la glicoproteína del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris* utilizando una estrategia DO-STAT.** Picotto L, Sguazza G, Galosi C, Cavalitto S, Pecoraro M. Presentación en formato poster.

XXXVI Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Virología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 5-6 de Diciembre de 2016. **Producción de proteínas rábicas recombinantes para su uso en medicina veterinaria.** Picotto L, Sguazza G, Galosi C, Cavalitto S, Pecoraro M. Presentación oral.

XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Rosario, Santa Fe. 26 al 30 de Septiembre de 2016. **Expresión de la nucleoproteína del virus de la rabia en *Escherichia coli*.** Picotto L, Sguazza G, Tizzano M, Galosi C, Cavalitto S, Pecoraro M. Presentación en formato poster.

Simposio Argentino sobre Rabia (organizado por la Fundación Pablo Casará). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 30 de Junio al 1 de Julio de 2016. **Producción de proteínas rábicas recombinantes para su uso en medicina veterinaria.** Picotto L, Sguazza G, Cavalitto S, Pecoraro M. Presentación oral.

XI Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latinoamericano de Virología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 24 de Junio de 2015.

Expresión de la glicoproteína del virus de la rabia en *Pichia Pastoris*.

Picotto L, Sguazza G, Galosi C, Cavalitto S, Pecoraro M. Presentación en formato poster.

Jornada de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. La Plata. 28 de Noviembre de 2014. **Desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción heteróloga de proteínas del virus de la rabia para su uso en medicina veterinaria.** Picotto L. Presentación oral.

Parte de los resultados de la presente tesis fue reconocido con el siguiente premio:

Premio “Tesis en curso” otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. La Plata. Septiembre del 2015. **Obtención de la glicoproteína del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris*, para su uso en medicina veterinaria.** Picotto L.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	XIII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCION.....	7
1.1 Rhabdovirus.....	7
1.1.1 Taxonomía y características de la familia viral.....	7
1.1.2 Composición y estructura interna del virión.....	9
1.1.3 Propiedades fisicoquímicas.....	11
1.1.4 Genoma viral.....	11
1.1.5 Proteínas.....	12
1.1.6 Transcripción.....	19
1.1.7 Replicación.....	21
1.1.8 Ciclo viral.....	22
1.2 Virus de la Rabia.....	27
1.2.1 Historia.....	27
1.2.2 Epidemiología.....	34
1.2.3 Patogenia.....	43
1.2.4 Signos clínicos.....	46
1.2.5 Diagnóstico.....	47
1.2.6 Prevención.....	51
1.2.7 Vacunas antirrábicas.....	52

1.2.8 Tratamiento.....	54
1.2.9 Estudios en vacunas antirrábicas.....	57
1.3 Expresión de proteínas recombinantes.....	61
1.3.1 Expresión en Bacterias.....	61
1.3.2 Expresión en Levaduras.....	63
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	65
2.1 Hipótesis de trabajo.....	65
2.2 Objetivos.....	65
2.2.1 Objetivos generales.....	65
2.2.2 Objetivos específicos.....	65
3. MATERIALES Y METODOS	66
3.1 Materiales.....	66
3.1.1 Cepas Bacterianas.....	66
3.1.2 Cepa de levadura.....	67
3.1.3 Virus.....	67
3.1.4 Vectores de clonado y expresión.....	67
3.1.5 Medios de cultivo.....	71
3.1.6 Anticuerpos.....	76
3.1.7 Animales de Experimentación.....	76
3.2 Métodos generales.....	78
3.2.1 Cultivos celulares en pequeña escala.....	78
3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	79
3.2.3 Transformación de bacterias competentes.....	82

3.2.4	Transformación de levaduras competentes.....	83
3.2.5	Extracción de DNA plasmídico.....	85
3.2.6	Cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas.....	86
3.2.7	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	88
3.2.8	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	89
3.2.9	Western blot.....	91
3.3	Obtención del ADNc viral.....	92
3.3.1	Diseño de los primers.....	94
3.3.2	Obtención del RNA viral.....	96
3.3.3	Retrotranscripción.....	95
3.4	Expresión de la nucleoproteína en bacterias.....	96
3.4.1	Amplificación por PCR.....	96
3.4.2	Ligación en el vector pQE-30 y transformación en <i>E. coli</i>	97
3.4.3	Análisis de las colonias de <i>E. coli</i>	98
3.4.4	Expresión de la nucleoproteína.....	99
3.4.5	Determinación del tiempo de inducción adecuado.....	100
3.4.6	Escalado.....	101
3.4.7	Purificación de la proteína.....	102
3.5	Expresión de la glicoproteína en levaduras.....	103
3.5.1	Amplificación por PCR del gen de la glicoproteína.....	103
3.5.2	Ligación en el vector pCR2.1-TOPO y transformación en <i>E. coli</i>	104
3.5.3	Ligación en el vector pPIC9 y transformación en <i>E. coli</i>	105

3.5.4 Transformación del plásmido pPIC9-G en <i>Pichia pastoris</i>	107
3.5.5 Análisis de las colonias de <i>P. pastoris</i>	108
3.5.6 Expresión de la glicoproteína.....	109
3.5.7 Escalado.....	110
3.5.8 Purificación de la proteína.....	112
3.5.9 Ensayo de glicosilación.....	114
3.6 Ensayos inmunológicos.....	114
3.6.1 Ensayo de desafío.....	114
3.6.2 Estimación de la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes.....	117
4. RESULTADOS.....	119
4.1 Expresión de la nucleoproteína en bacterias.....	119
4.1.1 Amplificación por PCR del gen de la nucleoproteína.....	119
4.1.2 Ligación en el vector pQE-30 y transformación en <i>E. coli</i>	120
4.1.3 Análisis de las colonias.....	121
4.1.4 Expresión de la nucleoproteína.....	125
4.1.5 Determinación de la concentración de inductor y el tiempo de inducción adecuados.....	126
4.1.6 Escalado.....	129
4.1.7 Purificación de la proteína.....	130
4.2 Expresión de la glicoproteína en levaduras.....	132
4.2.1 Amplificación por PCR del gen de la glicoproteína.....	132

4.2.2 Ligación en el vector pCR2.1-TOPO y transformación en <i>E. coli</i>	133
4.2.3 Ligación en el vector pPIC9 y transformación en <i>E. coli</i>	135
4.2.4 Transformación del plásmido pPIC9-G en <i>Pichia pastoris</i>	137
4.2.5 Análisis de las colonias.....	138
4.2.6 Expresión de la glicoproteína.....	142
4.2.7 Escalado.....	143
4.2.8 Purificación de la proteína.....	146
4.3 Ensayos inmunológicos.....	147
4.3.1 Ensayo de desafío.....	147
4.3.2 Estimación de la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes.....	148
5. DISCUSIÓN.....	149
6. BIBLIOGRAFÍA.....	168

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Micrografía electrónica de las partículas del virus de la rabia.....	9
Figura 2. Estructura interna del virión de la rabia.....	11
Figura 3. Organización genómica de los Lyssavirus.....	12
Figura 4. Organización estructural del virus de la rabia.....	14
Figura 5. Ciclo de replicación de un rhabdovirus.....	23
Figura 6. Distribución mundial del virus de la rabia.....	35
Figura 7. Ciclos aéreo y terrestre de la rabia.....	40
Figura 8. Distribución de los casos de rabia en Argentina 2017.....	43
Figura 9. Patogenia del virus de la rabia en canino y humano.....	44
Figura 10. Vector de expresión pQE-30.....	68
Figura 11. Vector de clonado pCR2.1-TOPO (Invitrogen).....	69
Figura 12. Vector de expresión pPIC9 (Invitrogen).....	70
Figura 13. Amplificación por RT-PCR del segmento N.....	120
Figura 14. <i>Colony</i> -PCR transformación pQE-30-N.....	122
Figura 15. Secuencia nucleotídica de la nucleoproteína N recombinante.....	123
Figura 16. Secuencia aminoacídica de la nucleoproteína N recombinante deducida de la secuencia nucleotídica.....	124
Figura 17. Western blot de las proteínas totales de cultivos bacterianos...	126
Figura 18. SDS-PAGE para determinar el tiempo de inducción adecuado de los cultivos bacterianos.....	127
Figura 19. Western blot para determinar el tiempo de inducción de los cultivos bacterianos.....	128

Figura 20. Western blot de las proteínas citoplasmáticas totales del cultivo en fermentador de <i>E. coli</i> M15 conteniendo al vector pQE-30-N-His y de las fracciones de la purificación.....	130
Figura 21. SDS-PAGE de la N-His purificada con un patrón de seroalbúmina bovina (BSA).....	131
Figura 22. Amplificación por RT-PCR del segmento G.....	133
Figura 23. <i>Colony</i> -PCR transformación pCR2.1-TOPO-G.....	134
Figura 24. Estructura del plásmido pPIC9-G.....	135
Figura 25. <i>Colony</i> -PCR con <i>primers</i> AOX1.....	137
Figura 26. Recombinación del cassette de expresión en <i>P. pastoris</i> GS115.....	138
Figura 27. Confirmación de la transformación en <i>P. pastoris</i> por <i>colony</i> -PCR con <i>primers</i> AOX1.....	139
Figura 28. Secuencia nucleotídica de la glicoproteína G recombinante.....	140
Figura 29. Secuencia aminoacídica de la glicoproteína G recombinante deducida de la la nucleotídica.....	secuencia 141
Figura 30. SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos <i>P. pastoris</i> en pequeña escala en medio BMG/BMM a las 48 horas de inducción.....	142
Figura 31. Datos de la fermentación de alta densidad del cultivo de <i>P. pastoris</i> recombinante.....	144
Figura 32. Análisis por SDS-PAGE y western blot del sobrenadante de cultivo en fermentador.....	145

Figura 33. SDS-PAGE eluatos de la cromatografía del cultivo de <i>P. pastoris</i> -G en fermentador.....	146
Figura 34. Western blot de los sueros de ratones inoculados con las proteínas recombinantes.....	148
Tabla 1. Géneros de la familia <i>Rhabdoviridae</i>	8
Tabla 2. Ensayos diagnósticos para rabia.....	50
Tabla 3. Tratamiento pre exposición con vacunas producidas en cultivo celular.....	55
Tabla 4. Medidas profilácticas post exposición recomendadas.....	57
Tabla 5. Tratamiento post exposición con vacunas producidas en cultivo celular.....	57
Tabla 6. Mezcla de reacción general de PCR.....	79
Tabla 7. <i>Primers</i> utilizados.....	80
Tabla 8. Soluciones para la extracción de ADN plasmídico.....	86
Tabla 9. Soluciones para medir ácidos nucleicos y proteínas por fluorometría.....	87
Tabla 10. Reactivos y tipos de geles de poliacrilamida empleados.....	90
Tabla 11. Mezcla de retrotranscripción.....	96
Tabla 12. Perfil de ciclado para la amplificación del gen N.....	96
Tabla 13. Reacción de ligación pQE-30-N.....	98
Tabla 14. Perfil de ciclado para la amplificación del gen G.....	103
Tabla 15. Reacción de ligación pCR2.1-TOPO-G.....	104
Tabla 16. Reacción de ligación pPIC9-G.....	106
Tabla 17. Protocolo de inmunización para análisis cualitativo de anticuerpos.....	118

Tabla 18. Reacción de ligación pQE-30-N.....	121
Tabla 19. Reacción de ligación pCR2.1-TOPO-G.....	133
Tabla 20. Reacción de ligación pPIC9-G.....	136

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Amp	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Axnm	absorbancia a x nm
bla	gen de la β -lactamasa
BMG	<i>buffered minimal glycerol</i>
BMM	<i>buffered minimal methanol</i>
Bp	pares de bases
BSA	seroalbúmina bovina
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
cm	centímetro(s)
csp.	cantidad suficiente para...
DAB	diaminobencidina
dNTPs	deoxiribonucleósidos-trifosfato
DO600nm	densidad óptica a 600nm
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ELISA	enzimo inmuno ensayo
G	glicoproteína
g	gramos

g/l	gramos por litro
His	histidina
hs	horas
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
ICTV	Comité internacional de Taxonomía de Virus
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IgG	inmunoglobulina G
IMAC	cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ISCOM	complejo inmunoestimulante
Kan	kanamicina
Kb	kilo pares de bases
KDa	Kilodaltons
KDa	kilodaltons
l	litro
L	ARN polimerasa
LB	Luria Bertani
M	concentración molar
M	proteína de matriz
M	concentración molar
mA	miliampers
MD	<i>minimal dextrose medium</i>

mg	miligramos
µg	microgramo
µl	microlitro
ml	mililitro
µM	micromolar
mM	milimolar
MM	<i>minimal methanol medium</i>
N	nucleoproteína
Ng	nanogramo
nm	nanómetro(s)
nt	nucleótidos
° C	grado centígrado
ORF	marco de lectura abierto
P	fosfoproteína
PBS	solución buffer de fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RABV	virus de la rabia
RNP	complejo ribonucleoproteico
s.c.	subcutánea
SCM	Sitio de Clonado Múltiple
SDS	dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
Temed:	N,N,N,N'-tetrametiletildiamina

UI	unidades internacionales
V	voltios
VC	volumen de columna
YPD	<i>yeast peptone dextrose médium</i>

Desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción heteróloga de proteínas del virus de la rabia para su uso en medicina veterinaria.

Palabras clave: nucleoproteína, glicoproteína, inmunogenicidad, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*.

Resumen

El virus de la rabia causa una forma letal de encefalomiелitis tanto en seres humanos como en animales. El control de la rabia canina, mediante programas de vacunación masiva y eliminación de los perros callejeros, puede reducir la incidencia de la rabia en humanos. En Argentina, las campañas de vacunación utilizan vacunas producidas en cerebro de ratones lactantes, pero la producción de estas vacunas involucra la manipulación del virus activo y es costosa; además, ha sido desaconsejada por la Organización Mundial de la Salud. Debido a que la rabia afecta, principalmente, países en desarrollo, es necesaria una solución económica.

En este contexto, se estudió la producción recombinante de las proteínas más inmunogénicas del virus de la rabia: la glicoproteína y la nucleoproteína, en bacterias y levaduras, como alternativa al método actual de producción. Estos sistemas de expresión fueron seleccionados debido a las ventajas técnicas que presentan: fácil manipulación, altos niveles de expresión de proteínas y relativa sencillez para escalar.

Los resultados encontrados indican que las proteínas recombinantes obtenidas se expresaron y purificaron de manera sencilla, pudiendo ser usadas como fuente segura de antígeno en la producción de una vacuna a subunidades, para la prevención de la enfermedad. La inmunogenicidad de

las proteínas recombinantes fue evaluada mediante el ensayo de potencia del NIH, pero no se logró generar protección en los ratones. Sin embargo, las proteínas recombinantes fueron capaces de producir anticuerpos específicos contra las proteínas nativas del virus, aunque en un título menor al necesario para generar protección ante un desafío viral. Estos resultados son alentadores con vistas al futuro, debido a que mediante nuevos estudios, incrementando las concentraciones de antígenos y utilizando otros adyuvantes, sería posible alcanzar títulos de anticuerpos específicos a la rabia capaces de producir protección ante un desafío viral.

Biotechnological processes development for heterologous production of rabies proteins for its use in veterinary medicine

Key words: *nucleoprotein, glycoprotein, immunogenicity, Pichia pastoris, Escherichia coli.*

Abstract

The rabies virus causes a lethal form of encephalomyelitis in both humans and animals. The control of canine rabies, through vaccination programs and eliminating stray dogs can reduce the incidence of human rabies. In Argentina, vaccination campaigns use vaccines produced in the brain of suckling mice. Production of this vaccine involves handling live virus and is expensive. In addition, it has been discouraged by the World Health Organization. Rabies is a worldwide disease which mainly affects developing countries. Thus, an efficient and affordable solution is needed.

In this context, the production of the most immunogenic proteins of rabies virus (the glycoprotein and the nucleoprotein) was studied in bacteria and yeasts, as an alternative to the current vaccine production method. These expression systems were selected due to the technical advantages they present: easy handling, high levels of protein expression and relative simplicity to scale.

Results show that the recombinant rabies proteins were expressed and purified easily, and can be used as a safe source of antigen in the production of a subunit vaccine, for the prevention of the disease. The immunogenicity of the recombinant proteins was assessed by the NIH potency assay, but protection was not achieved in the mice. However, the recombinant proteins

were able to produce specific antibodies against the native proteins of the virus, although in a lower titer than necessary to generate protection against a viral challenge. These results are encouraging for the future, because through new studies, by increasing antigen concentrations or with the use of other adjuvants, it would be possible to reach specific titers of antibodies against rabies capable of producing protection against a viral challenge.

INTRODUCCION

1.1 Rhabdovirus

1.1.1 Taxonomía y características de la familia viral

El orden de los *Mononegavirales* está formado por un amplio grupo de virus con genoma de ARN de polaridad negativa y no segmentado. En la actualidad, según el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) el orden incluye a ocho familias virales: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Mymonaviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Sunviridae*.

La familia *Rhaboviridae* (del griego *rhabdo*, que significa barra) comprende a una gran variedad de virus envueltos con genoma de ARN de cadena simple y polaridad negativa, cuya morfología es en forma de barra o bala (Wagner, 1987). Existen algunas excepciones de virus dentro de la familia cuyo genoma se compone de ARN bipartito y que suelen no ser envueltos. La familia incluye patógenos de muchos animales y plantas, incluyendo los seres humanos, animales de granja, peces y cultivos, con gran impacto en la salud pública, veterinaria y en la agricultura. La vía de transmisión de los rhabdovirus es muy variada (Kuzmin y col., 2008). La mayoría son transmitidos mediante artrópodos hacia otros hospedadores (animales, plantas), otros pueden ser transmitidos mediante mordeduras o lameduras entre mamíferos. Aquellos rhabdovirus que afectan peces son transmitidos por el agua, mientras que algunos rhabdovirus de plantas se transmiten mecánicamente por contacto directo.

Basados en análisis filogenéticos, propiedades estructurales y antigénicas, los rhabdovirus se encuentran agrupados en dieciocho géneros (Tabla 1) (ICTV, Diciembre de 2017). A la fecha, se encuentran cuatro especies sin ser clasificadas.

Género	Cantidad especies	Especie tipo	Hospedadores	Referencia
<i>Almendravirus</i>	5	<i>Almendravirus Puerto Almendras</i>	Artrópodos	Contreras y col., 2017
<i>Curiovirus</i>	4	<i>Curionopolis curiovirus</i>	Artrópodos	Medeiros y col., 2014
<i>Cytorhabdovirus</i>	11	<i>Cytorhabdovirus de la necrosis amarilla de la lechuga</i>	Plantas	Dietzgen y col., 2006
<i>Dichorhavirus</i>	2	<i>Dichorhavirus de la mancha de la orquídea</i>	Artrópodos	Dietzgen y col., 2014
<i>Ephemerovirus</i>	8	<i>Ephemerovirus de la fiebre bovina</i>	Animales	Walker y Klement, 2015
<i>Hapavirus</i>	15	<i>Hapavirus Flanders</i>	Artrópodos	Gubala y col., 2017
<i>Ledantavirus</i>	14	<i>Le Dantec virus</i>	Murciélagos, insectos, roedores y humanos	Blasdell y col., 2015
<i>Lyssavirus</i>	14	<i>Virus de la rabia</i>	Mamíferos	Freuling y col., 2011
<i>Novirhabdovirus</i>	4	<i>Novirhabdovirus de la necrosis hematopoyética infecciosa</i>	Peces	Kell y col., 2013
<i>Nucleorhabdovirus</i>	10	<i>Nucleorhabdovirus de la papa amarilla enana</i>	Artrópodos y Plantas	Jackson y Li, 2016
<i>Perhabdovirus</i>	3	<i>Perhabdovirus de la perca</i>	Peces	Stone y col., 2013
<i>Sigmavirus</i>	7	<i>Sigmavirus de Drosophila melanogaster</i>	Artrópodos	Longdon y col., 2017
<i>Sprivivirus</i>	2	<i>Sprivivirus de la carpa</i>	Peces	Ruane y col., 2014
<i>Sripuvirus</i>	5	<i>Niakha sripuvirus</i>	Insectos y lagartos	Vasilakis y col., 2013
<i>Tibrovirus</i>	6	<i>Tibrovirus Tibrogargan</i>	Artrópodos	Stremlau y col., 2015
<i>Tupavirus</i>	3	<i>Tupavirus Durham</i>	Aves	ICTV, 2015
<i>Varicosavirus</i>	1	<i>Varicosavirus asociado a las venas grandes de la lechuga</i>	Plantas	Sayasa y col., 2005
<i>Vesiculovirus</i>	16	<i>Vesiculovirus Indiana</i>	Mamíferos, insectos y peces	Letchworth y col., 1999

Tabla 1. Géneros de la familia *Rhabdoviridae* (ICTV, Noviembre 2017).

1.1.2 Composición y estructura interna del virión.

El virus de la rabia, al igual que todos los rhabdovirus, está compuesto principalmente por ARN (2-3%), proteínas (67-74%), lípidos (20-26%) e hidratos de carbono (3%).

El virus presenta una estructura característica en forma de bala o cónica, con un extremo semiesférico y el otro plano (Figura 1). Los viriones tienen una longitud que oscila entre 130 y 250 nm, y un diámetro entre 60 y 110 nm (Davies y col., 1963; Hummeler y col., 1967).



Figura 1. Micrografía electrónica de las partículas del virus de la rabia (Matsumoto, 1962).

El ARN viral se encuentra enrollado helicoidalmente y asociado a proteínas formando el complejo ribonucleoproteico (RNP). El RNP se extiende a lo

largo de la partícula viral formando el esqueleto de la misma. El RNP está formado por el ARN viral junto con las proteínas nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y polimerasa (L). El genoma de ARN es monocatenario y no segmentado, y tiene una polaridad de sentido negativo. Esto implica que el genoma no es infeccioso.

El extremo cónico de la partícula viral está formado por siete vueltas de una espiral antes de alcanzar el tronco cilíndrico, que contiene aproximadamente 29 vueltas espirales (Ge y col., 2010). El extremo cónico representa aproximadamente el 25 % de la longitud total del virión y el tronco cilíndrico el restante 75 %. El extremo 5' del ARN del virión se encuentra localizado en el lado cónico de la bala, mientras que el extremo 3' se sitúa en la base del tronco.

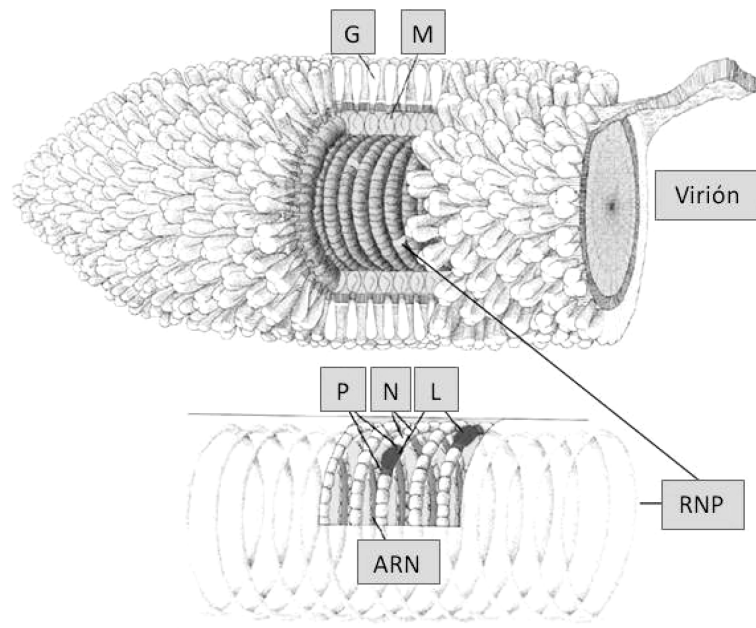


Figura 2. Estructura interna del virión de la rabia (Wunner y col. 1988).

En el interior del virión se encuentra el RNP enrollado helicoidalmente con una periodicidad de 7,5 nm por vuelta (Figura 2). El RNP se asocia a la proteína de matriz (M) para formar el esqueleto del virión (Mebatsion y col., 1999). Una vez que las partículas virales maduran y brotan a través de la membrana celular de la célula infectada, el esqueleto viral adquiere la envoltura, formada por un bicapa lipídica de 7,5 a 10 nm de grosor que rodea al virión maduro. En la superficie externa de la envoltura viral, se encuentran proyecciones que miden de 8,3 a 10 nm de longitud aproximadamente y están formadas por trímeros de la glicoproteína (G) (Gaudin y col., 1992).

1.1.3 Propiedades fisicoquímicas

Los rhabdovirus son relativamente estables en el ambiente, sobre todo si el pH es ligeramente alcalino. Son virus termolábiles y sensibles a la irradiación ultravioleta de la luz solar. Son inactivados fácilmente por desinfectantes a base de detergentes y preparados que contienen yodo.

1.1.4 Genoma viral

El genoma de los rhabdovirus virus consiste en una única molécula de ARN de cadena simple y polaridad negativa (con la excepción de los *Dichorhavirus* que presentan ARN bipartito), con un tamaño que oscila entre 11 y 15 kb. Mas del 99 % del ARN genómico (ARNg) de los Lyssavirus (Figura 3) es codificante y consta de cinco genes en un orden altamente

conservado (3'-N-P-M-G-L-5'). Éstos, se encuentran flanqueados por dos secuencias cortas regulatorias extragénicas que se denominan líder Le (del inglés *leader*) y remolque Tr (del inglés *trailer*).

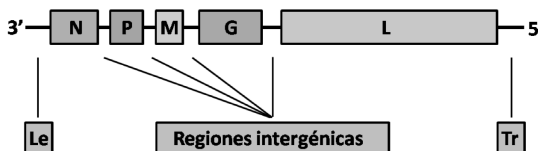


Figura 3. Organización genómica de los Lyssavirus.

Le actúa como promotor genómico (Pg), dirigiendo la transcripción de los ARN mensajeros monocistrónicos (ARNm) y la síntesis del ARN antigenómico de longitud completa (ARNag). El extremo 3' del ARNag (la secuencia complementaria a Tr en el ARNg) funciona como promotor antigenómico (Pag) y, a diferencia de Le, sólo dirige la síntesis de ARNg de longitud completa encapsidado por la nucleoproteína. Las secuencias complementarias a Tr y Le, tienen una composición similar. De hecho, en el virus de la rabia los primeros 11 nucleótidos son idénticos (Tordo y col., 1986, Tordo y col., 1988). Esta característica, es muy común entre los mononegavirales y demuestra la importancia de las secuencias terminales para el promotor (Whelan y col., 2004).

1.1.5 Proteínas

El virión de la rabia presenta cinco proteínas. Las proteínas N, P y L se encuentran asociadas al ARN viral formando el RNP, mientras que las proteínas M y G están asociadas a la envoltura lipídica que rodea al RNP (Figura 4).

Las proteínas N, P y L están involucradas en la actividad ARN polimerasa del virión. N y P se encuentran fosforiladas en el virus de la rabia, a diferencia del resto de los rhabdovirus, donde sólo P está fosforilada (Gupta y col., 2000; Sokol y col., 1974). La proteína más abundante del RNP es la nucleoproteína N con 1325 copias, seguida de la P con 691 copias y la L con 25 copias (Flamand y col., 1993).

La proteína M se encuentra asociada en un extremo con la glicoproteína G en la envoltura viral, mientras que el resto se encuentra en el interior del virión, donde interactúa con la nucleoproteína N y funciona como nexo entre el RNP y la envoltura viral (Guichard y col., 2011). La capacidad de asociarse con el RNP y con la G, le permite tener un rol importante en el proceso de brotación de la progenie viral en la membrana celular de las células infectadas (Mebatsion y col., 1999). La G, única proteína que se encuentra glicosilada, se asocia en trímeros en la superficie del virión formando proyecciones en forma de espículas (Gaudin y col., 1992). La glicosilación es de tipo ramificada y representa un 10-12 % de la masa total de la G. El número de copias de G y M por virión se estima en 1205 y 1148, respectivamente (Flamand y col., 1993). Esto supone un número aproximado de 400 espículas en la superficie de cada virión.

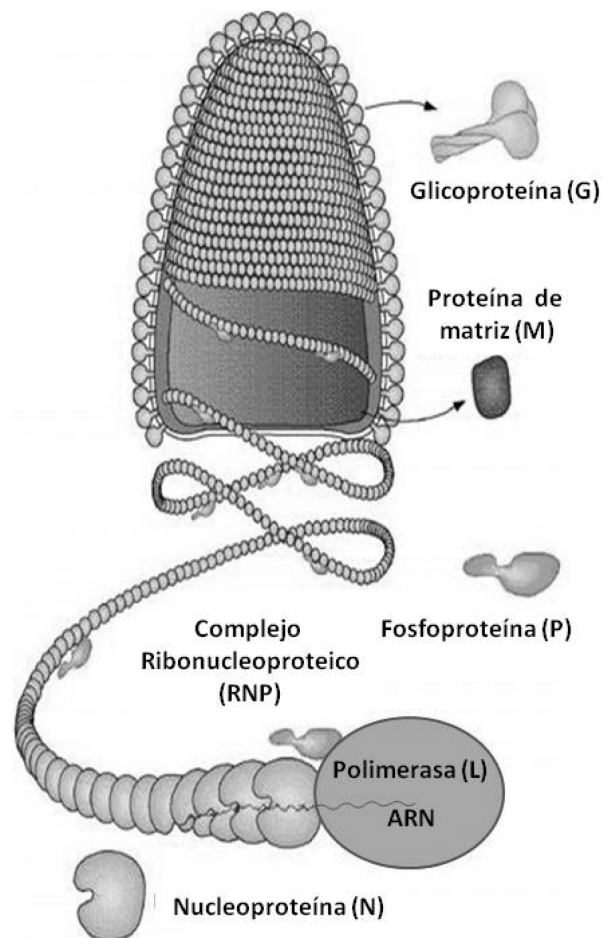


Figura 4. Organización estructural del virus de la rabia

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/2.html).

La nucleoproteína N del virus de la rabia de la cepa Pasteur contiene 450 aminoácidos y un tamaño aproximado de 51 kDa. La secuencia de aminoácidos de N es la más conservada entre las proteínas de los lyssavirus (Marston y col., 2007). Esta elevada conservación radica principalmente en las regiones que interactúan específicamente con el ARN viral. Sin embargo, existe un grado relativamente alto de diversidad genética en segmentos

cortos entre distintos genotipos (Bourhy y col., 1993; Bourhy y col., 1999; Kissi y col., 1995). Estas pequeñas variaciones genéticas, proporcionan sitios específicos de unión (o epítopes) de anticuerpos monoclonales anti N, permitiendo diferenciar entre distintas cepas del virus de la rabia (Dietzschold y col., 1987; Flamand y col., 1980; Smith, 1989).

La nucleoproteína N es fosforilada en el residuo serina de la posición 389 (S389) por una casein quinasa celular II (Gupta y col., 2000); esta fosforilación estabiliza la interacción entre N y P en el RNP (Toriumi y Kawai, 2004). Además, algunos estudios sugieren que la fosforilación de N cumple un rol importante en la regulación de la transcripción y replicación del ARN viral (Liu y col., 2004; Yang y col., 1999). En cuanto al aspecto inmunológico, la nucleoproteína N es una proteína de gran interés ya que genera inmunidad contra un desafío de virus rábico en animales (Dietzschold y col., 1987). N es el principal objetivo para linfocitos T-helpers (Celis y col., 1988) y presenta varias características que hacen que funcione como superantígeno exógeno (Lafon y col., 1992): es un potente activador de linfocitos periféricos en vacunas humanas; aumenta y acelera la respuesta de neutralización viral mediada por anticuerpos en vacunas antirrábicas inactivadas; genera la expansión y movilización de células T CD4+ para activar y soportar la neutralización viral; y tiene la capacidad de unirse a antígenos de HLA clase II expresados en la superficie de las células.

La P del virus de la rabia de la cepa Pasteur está formada por 297 aminoácidos, con un tamaño aproximado de 38 kDa y es la menos

conservada entre las proteínas rábicas. Es una proteína multifuncional: interactúa con N para formar el complejo N-P; funciona como chaperona para las nuevas moléculas de N sintetizadas previniendo su autoensamblado (polimerización); evita la unión inespecífica de N al ARN celular (Mavrakis y col., 2003), dirigiendo la nucleoproteína N encapsidación del ARN viral (Chenik y col., 1994; Gigant y col., 2000); funciona como cofactor no catalítico en el complejo P-L durante la transcripción y replicación del genoma viral; estabiliza a L, localizando al complejo P-L sobre el ARN, debido a que L es incapaz de hacerlo sola (Chenik y col., 1994; Fu y col., 1994).

La interacción simultánea de P con N y L, es posible debido a que P presenta dos dominios específicos separados de unión a estas proteínas. Durante la formación del RNP de la progenie viral, es necesario que P se una a L para producir el RNP activo.

La L del virus de la rabia de la cepa Pasteur contiene 2142 aminoácidos y tiene un tamaño de 244 kDa aproximadamente. Forma el componente catalítico del complejo de la polimerasa que participa en la transcripción y replicación del ARN viral. L tiene un rol muy importante al inicio de la infección, dando comienzo a la transcripción primaria del ARNg, luego de que se libere el RNP en el citoplasma de la célula infectada. Las principales actividades de L incluyen la iniciación y elongación de los ARNm, las modificaciones cotranscripcionales de los ARNm que incluyen la capsulación en el extremo 5', la metilación y la poliadenilación en el extremo 3'.

La M del virus de la rabia de la cepa Pasteur está compuesta por 202 aminoácidos, tiene un tamaño aproximado de 25 kDa (Tordo y col., 1986), y existe en dos isoformas. La isoforma mayor de 24 kDa (M α) representa el 70-75 % del total de M en el virión mientras que la forma menor de 23 kDa (M β) representa el 25-30 % (Ameyama y col., 2003). M forma dímeros que interactúan intensamente con G (Nakahara y col., 2003). Cumple la función de unirse y condensar al RNP nascente, originando RNP-M en forma de espiral, formando una envoltura alrededor de RNP con el esqueleto en forma de bala del virión. Aproximadamente 1200 copias de moléculas de M se unen al núcleo RNP. Además, M media la unión de la estructura a la membrana de la célula huésped, donde se inicia la brotación del virus (Mebatsion y col., 1999). Para ello, M (unida al RNP) interactúa con el dominio citoplasmático de G, aumentando considerablemente la eficacia de la brotación de los viriones (Mebatsion y col., 1999).

La glicoproteína G del virus de la rabia de la cepa Pasteur está compuesta por 524 aminoácidos, incluyendo 19 aminoácidos en el extremo N-terminal correspondientes a un dominio de péptido señal (PS). Éste permite la inserción en la membrana, dirigiendo a la proteína nascente por la vía retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi (donde es clivada del extremo N-terminal) y finalmente membrana plasmática (Conzelmann y col., 1990; Tordo y col., 1988). La glicoproteína G madura tiene 505 aminoácidos y un peso aproximado de 60 kDa. Es una glicoproteína de membrana de tipo I, que presenta tres dominios: un ectodominio N-terminal de 439 aminoácidos que

se extiende hacia afuera de la superficie de las partículas virales maduras, un dominio transmembrana de 22 aminoácidos, y un dominio citoplasmático de 44 aminoácidos en el extremo C-terminal. La glicoproteína G se asocia en trímeros en el aparato de Golgi, que luego dan lugar a las espículas de 8,3 nm que se encuentran incrustadas en la superficie del virión (Gaudin y col., 1992; Whitt y col., 1991). El dominio citoplasmático interactúa con M para completar el ensamblado del virión. El ectodominio es responsable de la interacción con los receptores celulares dirigiendo al virus a las células apropiadas a infectar (Sissoeff y col., 2005). Además, promueve la fusión inducida de la envoltura viral y la membrana endosomal en la fase temprana del ciclo celular (Albertini y col., 2012). Inmunológicamente, el ectodominio es muy importante ya que induce la respuesta inmune humoral en el huésped luego de la infección, siendo el blanco principal de los anticuerpos producidos así como de los linfocitos citotóxicos y helpers específicos (Celis y col., 1988; Macfarlan y col., 1986). Para que la glicoproteína G se exprese y funcione normalmente, es necesario que se encuentre correctamente glicosilada. Los oligosacáridos o glicanos asociados, se encuentran ligados a residuos de asparagina (N en código de una letra) y se dice que es una N-glicosilación. Las secuencias de glicosilación son NXS (asparagina-cualquier aminoácido distinto de prolina-serina) o NXT (asparagina-cualquier aminoácido distinto de prolina-treonina) (Shakin-Eshleman y col., 1992). Las moléculas de G pueden tener uno, dos o tres (y a veces cuatro) sitios de N-glicosilación por molécula dependiendo de la cepa del virus (Wunner y col.,

1985). Los glicanos se pre sintetizan en la célula y se transfieren desde un precursor lipídico (Glc3Man9GlcNAc2) a las secuencias específicas de N glicosilación de la glicoproteína G naciente, gracias a la acción de la enzima oligosacaril transferasa. La transferencia ocurre cuando la proteína, que se sintetiza en los ribosomas asociados al RE, comienza a plegarse co-traduccionalmente y durante la translocación a la membrana citoplasmática. Luego de que el núcleo-oligosacárido precursor se transfiere, el oligosacárido triglucosilado rico en manosa se recorta y procesa en el lumen del RE y Golgi para formar el oligosacárido monoglucosilado de la molécula glicoproteína G madura. La glicosilación en el residuo N319 es esencial para el plegado correcto y completo de la glicoproteína G naciente y se requiere para el transporte posterior a la superficie celular; es por ello que se conserva en todos los genotipos de virus.

Si bien en la infección por rabia todos los componentes virales influyen sobre la patogenia viral (Faber y col., 2004, Morimoto y col., 2000), la glicoproteína G es crucial para la elección de la vía de neuroinvasión (Ito y col., 2001) determinando si el virus causará una infección letal. Esto se debe a la interacción temprana de las espículas de G con receptores específicos en células neuronales (Lafon, 2005).

1.1.6 Transcripción

Los genes del virus de la rabia son transcritos por la ARN polimerasa L, dando lugar a los ARNm virales que luego son traducidos por la maquinaria

celular de la célula infectada. Los ARNm formados, presentan un capuchón en el extremo 5' formado por una molécula de 7 metil-guanina que facilita el inicio de la traducción. La transcripción comienza en el promotor genómico localizado en el extremo 3' y de manera secuencial (Flamand y Delagneau, 1978).

Los genes codificantes están separados por secuencias señal conservadas, que dirigen la actividad de L durante la transcripción y son ignoradas durante la replicación del ARN. Estas señales, consisten en una secuencia de parada y poliadenilación para el ARN, río arriba, seguida de una secuencia de iniciación para el ARN río abajo. Las secuencias de parada e iniciación se encuentran separadas por secuencias intergénicas no transcriptas. En el virus de la rabia, las señales de parada / poliadenilación constan de una serie de 7 residuos uracilo (3'-...ACUUUUUUU...-5'). Cuando la ARN polimerasa llega a esta señal, va hacia adelante y atrás, repetidamente, generando una cadena de 50 a 150 nucleótidos de adenina (poli A) (Barr y col., 1997). A continuación, L libera el ARNm poliadenilado recién generado e inicia la transcripción del gen río abajo en la siguiente señal de inicio conservada (3'...UUGURRNGA...-5', donde R = G o A, N = cualquier nucleótido). El reinicio implica la adición del capuchón en 5' de 7 metil-guanilato por la proteína L (Lij y col., 2008). La señal de parada / poliadenilación en el gen L (último gen del genoma) no está seguida por una señal de reinicio, lo que implica que la secuencia Tr río abajo no es transcripta.

Debido a que L se une y comienza a funcionar en el extremo 3' del genoma, y eventualmente puede disociarse al final de cada gen, se genera un gradiente de transcripción, donde los ARNm más cercanos al extremo 3' se sintetizan en mayor cantidad. De esta manera, el virus puede alcanzar niveles diferenciales de expresión de sus productos génicos. Además, la longitud de las secuencias intergénicas se correlaciona con la capacidad que tiene la polimerasa para disociarse; si las secuencias intergénicas son cortas (2 a 5 nt), no se produce la disociación de la polimerasa, como ocurre entre los genes N/P, P/M y M/G. En cambio, la secuencia intergénica de 24 nt entre los genes G/L provoca un elevado grado de disociación, generando una regulación hacia abajo en la expresión del gen L (Finke y col., 2000).

1.1.7 Replicación

La replicación del genoma viral (ARNg) comienza con la síntesis del antígenoma completo (ARNag), que actúa como molde de replicación. En este caso, L funciona como replicasa en vez de transcriptasa, ignorando las secuencias intergénicas que regulan la transcripción. La síntesis es dependiente de un cebador de ARN y comienza en el extremo 3' del ARNg, produciendo el extremo 5' del ARNag. A medida que va ocurriendo la elongación del ARNag, éste es encapsidado por moléculas de N, que previamente se encuentra asociada a P. Si la cantidad de N y P asociadas es suficientemente elevada, la síntesis del ARNag encapsidado ocurre progresivamente hasta que se alcanza el extremo 5' del molde de ARNg. El

ARNag encapsidado por N (N-ARNag) puede dirigir la síntesis del ARNg encapsidado por N (N-ARNg), siempre y cuando la cantidad de N sea lo suficientemente elevada (Blumberg y col., 1983).

El Pag de los rhabdovirus es mucho más activo dirigiendo la replicación que el Pg, generando en las células infectadas una cantidad abrumadora de N-ARNg, útil para la transcripción, replicación y ensamblado de la progenie viral. De hecho, el ARNg representa el 98 % del ARN total en células infectadas con el virus de la rabia (Finke y Conzelmann, 1999; Whelan y col., 2004).

1.1.8 Ciclo viral

El ciclo viral de los rhabdovirus (Figura 5) puede dividirse en tres etapas.

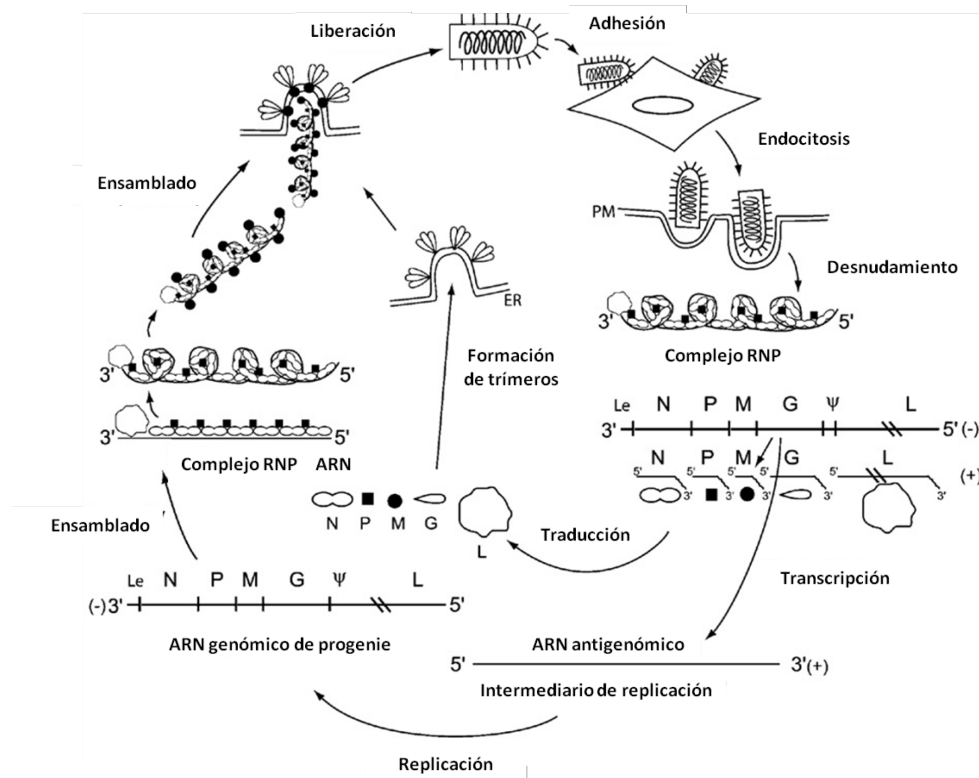


Figura 5. Ciclo de replicación de un rhabdovirus (Jackson, 2013:

La primera etapa o fase temprana, involucra la adhesión del virus a los receptores, el ingreso, y el desnudamiento de las partículas virales en el citoplasma de las células susceptibles. La segunda etapa o fase media, incluye la transcripción y replicación del genoma viral, y la traducción de las proteínas virales. En la tercera etapa o fase tardía ocurre el ensamblaje del virus y la liberación de las células infectadas.

Fase temprana: La infección comienza con la adhesión del virus a la superficie de la célula susceptible y la penetración a través de la vía de transporte endosomal (Le Blanc y col., 2005). El virus se adhiere a un

receptor o unidad receptora celular (URC) en la superficie celular que permite su entrada en las células susceptibles. Si bien diversas moléculas localizadas en la superficie celular pueden actuar de receptores en la unión del virus de la rabia (lípidos, gangliósidos hidratos de carbono y proteínas), ninguna mostró ser específica (Broughan y Wunner, 1995; Conti y col., 1988; Wunner y col., 1984). Las URC más conocidas son: el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), encontrado en las uniones neuromusculares (Lewis y col., 2000); la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) CD56, localizado en la superficie celular de las líneas celulares susceptibles al virus de la rabia (Thoulouze y col., 1998); y el receptor de neurotrofina de baja afinidad (p75NTR) (Langevin y Tuffereau, 2002). Luego de la unión del virus al receptor o receptores, éste es internalizado por endocitosis o viropexis. Dentro del compartimiento endosomal y debido al bajo pH (entre 6,3 y 6,5), la glicoproteína G se activa y adopta un estado hidrofóbico, exponiendo un dominio fusogénico que interactúa con la membrana endosomal y provoca el desnudamiento del virus con la liberación de la ribonucleocápside en el citoplasma de la célula infectada.

Fase media: Esta etapa comienza con la relajación del RNP-M, mediante la disociación de M durante el desnudamiento, dando lugar a una hélice en espiral (Iseni y col., 1998), permitiendo que los eventos de transcripción y replicación del ARN viral se lleven a cabo.

El RNP actúa de molde en la transcripción primaria, que corresponde a la síntesis de ARNm para formar aproximadamente 50 complejos de L-P que se asocian al RNP. Los transcritos de ARNm monocistrónicos, con el capuchón en 5' y poliadenilados en 3', son producidos a partir del modelo de parada/reinicio generando el gradiente de transcripción. A continuación, estos ARNm son utilizados como moldes para traducir las proteínas virales, mediante la maquinaria de la célula hospedadora (Flamand y Delagneau, 1978; Holloway y Obijeski, 1980). Los ARNm para la glicoproteína G son traducidos en polirribosomas asociados a membrana. A medida que la glicoproteína G está siendo traducida, es insertada en el lumen del RE donde ocurre la formación de los puentes de sulfuro, la N-glicosilación en los residuos asparagina específicos y el plegado correcto de los monómeros, gracias a chaperonas moleculares disponibles que luego se asocian dando lugar a homotrímeros (Gaudin y col., 1992; Whitt y col., 1991). El procesamiento final de las cadenas laterales de hidratos de carbono unidas a N, tiene lugar en el aparato de Golgi. Los cuatro ARNm virales restantes (N, P, M y L) son traducidos en polisomas libres en el citoplasma.

La acumulación de las proteínas virales N y P, permite iniciar la replicación con la síntesis del ARNag de longitud completa, que es N encapsidado a medida que es producido. El ARNag-N formado sirve de molde para la replicación del ARNg de longitud completa, y también para la transcripción secundaria y expresión de proteínas.

La acumulación de proteínas genera cuerpos de inclusión citoplasmáticos que incrementan de tamaño con el tiempo. Estos cuerpos de inclusión, que en las células neuronales se conocen como cuerpos de Negri (Kristensson y col., 1996), son rápidamente detectables por tinción y son utilizados para el diagnóstico de infección por rabia. Los cuerpos de inclusión están compuestos en gran parte de N y P, pero además contienen L (Finke y col., 2004) y moléculas recién sintetizadas de ARNg, ARNag y ARNm (Lahaye y col., 2009).

Fase tardía: El ensamblaje del virus comienza en la fase media (y continúa también en la fase tardía) con la nucleoproteína N encapsidación del ARNg y la formación del RNP, que necesita previamente de la acumulación de N, P y L (Iseni y col., 1998; Liu y col., 2004; Mavrakis y col., 2003).

La proteína multifuncional M, que se encuentra soluble en el citoplasma, tiene un rol crucial en las etapas que llevan a la formación de la progenie viral. En primer lugar, la asociación de M al RNP recién formado altera el balance entre la transcripción y replicación del ARN, inhibiendo la transcripción y estimulando la replicación (Finke y col., 2003; Ito y col., 1996). Además, M conduce al RNP enrollado hacia la membrana celular donde se concentran unidades de trímeros de G glicosilados e interactúa con G (Mebatsion y col., 1999). Finalmente, M altera la estructura del RNP estimulando su condensación que inhibe la actividad de la polimerasa. En esta última función M es envuelta por la membrana celular dando inicio al

proceso de brotación viral (Mebatsion y col., 1996; Mebatsion y col., 1999; Nakahara y col., 2003).

En las etapas finales del ciclo viral, los viriones maduros adquieren su envoltura lipídica cuando la estructura del RNP-M brota a través de la membrana de la célula huésped. También puede suceder la maduración intracelularmente, debido a la brotación a través del RE o del aparato de Golgi (Finke y col., 2010). Durante la brotación, ocurre la interacción de G con M, que permite estabilizar los trímeros de G en la superficie del virión para producir un brote eficiente. Si la brotación ocurre en una zona de la membrana plasmática (o del RE o Golgi) dónde se encuentran trímeros de G glicosilados, se producirán viriones infectivos que lleven espículas de trímeros de G ancladas en la envoltura viral (Whitt y col., 1991). Sin embargo, esto no excluye a la posibilidad de que puedan ocurrir brotes de viriones defectivos en zonas de la membrana celular que se encuentren libres de G (Mebatsion y col., 1996; Mebatsion y col., 1999). Si ocurre esto, se producirán viriones libres de espículas que no serán infecciosos (Mebatsion y col., 1996). Si la brotación ocurre desde las membranas del RE o el Golgi, los viriones se introducen en vesículas formadas por estas membranas que pueden ser secretadas de las células a través de esta vía de secreción.

1.2 Virus de la rabia

1.2.1 Historia

La rabia es una de las enfermedades virales más viejas de la cual se tiene registro. Los antiguos griegos utilizaban la palabra *lyssa* para referirse a la rabia en perros, que significa ira o furia. En escritos de Demócrito, Aristóteles, Hipócrates y Celsus se describen las características clínicas de la rabia (Fleming, 1872). Aristóteles escribió: “la enfermedad es fatal para el perro y para cualquier animal que pueda morder, excepto del hombre” (Wilkinson, 1977). En el año 100 AC, el médico Celsus describió la rabia humana y utilizó el término hidrofobia, que es una palabra derivada del griego y significa “miedo al agua”. Celsus reconoció que la saliva del animal mordedor contiene al agente venenoso: “la mordida tiene mayormente veneno”. Además, recomendó el tratamiento de las lastimaduras debidas a mordeduras de perros rabiosos con agentes cáusticos, quemando, cortando y succionando (Fleming, 1872).

En el año 1546, el médico italiano Girolamo Fracastoro afirmó: “Dado que este contagio no es comunicado por fomes y no es producido en la piel por simple contacto, sino que requiere de laceración en la piel, debemos suponer que sus gérmenes no son muy viscosos y que son demasiados gruesos para poder establecerse en los poros” (Wright, 1930). Independientemente que no se sabía de la existencia de los virus, Fracastoro tenía un correcto conocimiento del agente causal de la rabia. Además, escribió acerca de la rabia humana.

En el año 1769, el patólogo y padre de la anatomía patológica John Morgagni especuló que “el virus de la rabia parece que se propaga a través de las

fibras nerviosas y no a través de las venas hacia sus orígenes” (Alexander, 1960).

En el año 1793, John Hunter propuso estudiar la transmisión de la rabia entre diferentes especies. Sugirió que la transmisión por incisión y transferencia de saliva infectada en el sitio de corte podría ser factible (Hunter, 1793).

En el año 1804, Georg Gottfried Zinke demostró por primera vez la naturaleza infecciosa de la rabia (Zinke, 1804). Para ello, tomó saliva de un perro rabioso, la depositó en incisiones que había hecho en perros, gatos y conejos sanos, y comprobó que los animales desarrollaron posteriormente la enfermedad (Wilkinson, 1977).

En 1821, el neurofisiólogo francés François Magendie reportó la transmisión de la rabia de un humano hacia un perro mediante la inoculación de la saliva humana en el animal (Magendie, 1821).

En el año 1879, el profesor de una escuela veterinaria Pierre Victor Galtier utilizó conejos en sus experimentos con rabia debido a que eran más dóciles, menos peligrosos, más sencillos para mantener y más económicos que los perros y gatos. En los conejos estudiados, observó las características paralíticas y convulsivas de la enfermedad, y una reducción del período de incubación de un mes aproximado a 18 días en perros en promedio (Galtier, 1879). Poco después, este modelo experimental fue utilizado por Louis Pasteur.

Louis Pasteur fue un científico multidisciplinario francés que, en el año 1881, desarrolló una técnica para transmitir el virus de la rabia entre animales

mediante la inoculación de tejido cerebral de un perro rabioso, extraído asépticamente, en cerebros de otros perros sanos (Pasteur y col., 1881). De esta manera, se redujo el período de incubación de un mes a menos de tres semanas, respecto a perros infectados por mordeduras. Posteriormente, observó una reducción progresiva en el período de incubación hasta un límite de 6 a 7 días, en el que el virus y el período de incubación se convirtieron en "fijos" (Pasteur, 1885). Este virus fijo demostró ser más neurovirulento que el virus salvaje, tener un período de incubación menor y reproducible. Además, observó que los pasajes sucesivos del virus en el sistema nervioso central (SNC) produjeron la atenuación del virus luego de una inoculación periférica (Pasteur y col., 1884). El 6 de julio de 1885, Pasteur inició el tratamiento de un niño de 9 años llamado Joseph Meister, que había sido gravemente mordido dos días antes por un perro rabioso, ocasionándole más de una docena de mordeduras (superficiales y profundas) en muslos, pantorrillas y dedos. El tratamiento consistió en 13 inoculaciones con material infectado de médula espinal de conejo a los 11 días post infección. Utilizó tejido de la médula espinal debido a que presentaba un mayor título viral respecto al del tejido cerebral. El tejido de la médula espinal utilizado contenía virus fijo, que había sido previamente pasado en conejos y luego parcialmente inactivado por períodos de desecación de entre 15 días para la primera dosis y 1 día para la última dosis (Pasteur, 1885). Joseph Meister nunca desarrolló la rabia.

En 1886, Pasteur informó los resultados del tratamiento de 350 casos, donde sólo una persona desarrolló la rabia (Steele, 1975). Este individuo, fue un niño que inició el tratamiento 36 días luego de ser mordido. Años posteriores, cientos de miles de personas con potenciales exposiciones a la rabia fueron inmunizadas con las vacunas desarrolladas en el Instituto Pasteur de París, fundado en noviembre de 1888 y con sedes en otros lugares del mundo.

En el año 1889, Di Vestea y Zagari demostraron el desarrollo de la rabia luego de la inoculación del virus en los nervios ciáticos de conejo y perro. Además, comprobaron que la muerte podría prevenirse seccionando y cauterizando el nervio luego de la inyección (Di Vestea y Zagari, 1889). Por último, señalaron que los signos clínicos dependían de la localización del nervio inoculado y del sitio en el que éste entraba en el SNC.

En el año 1903, el patólogo y microbiólogo italiano Adelchi Negri aportó los primeros conocimientos acerca de la interacción del virus con la célula nerviosa en el cerebro de animales infectados por rabia (Negri, 1903). Mediante el método de tinción de Mann en neuronas del asta de Ammon, observó cuerpos de inclusión eosinófilos citoplasmáticos (hoy llamados corpúsculos de Negri) en cerebros de perros rabiosos (Kristensson y col 1996). Estos cuerpos de inclusión los denominó *Neurocytes hydrophobiae* (suponiendo que se debían a organismos protozoarios), y propuso que la detección de éstos podría ser utilizada para el diagnóstico de la rabia.

En el año 1903, el biólogo y médico francés Paul Remlinger demostró la filtrabilidad del virus de la rabia (Remlinger, 1903). El ensayo consistió en

mezclar un homogenato cerebral conteniendo el virus de la rabia con un cultivo virulento del agente de cólera de gallina (*Pasteurella multocida*), filtrar con un ultrafiltro e inocular el filtrado en conejos. La ausencia de *Pasteurella* en los conejos inoculados confirmó el éxito de la ultrafiltración, mientras que su posterior muerte por rabia demostró que el agente etiológico de la rabia era ultrafiltrable.

En el año 1911, David Semple diseñó un método para preparar una vacuna inactivada derivada de tejidos nerviosos de animales infectados debido a las complicaciones neuroparalíticas que solían presentar las vacunas antirrábicas de Pasteur. Para ello, inactivó al virus usando ácido carbónico (Semple, 1911). La vacuna Semple fue ampliamente utilizada en muchos países durante varias décadas.

En el año 1925, Goodpasture inoculó el virus salvaje de la rabia en el músculo masetero de conejos para determinar si el virus se diseminaba a través de cilindros axiales o dentro de los espacios linfáticos perineurales. Concluyó que el virus de la rabia pasa a través de los axones produciendo cambios degenerativos dentro de estas estructuras (Goodpasture, 1925).

En 1958, Goldwasser y Kissling utilizaron la inmunofluorescencia indirecta con el fin de identificar antígenos del virus de la rabia en preparados de tejidos cerebrales infectados con virus de la rabia fijo y salvaje. Para ello, utilizaron suero humano anti virus de la rabia como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario inmunoglobulinas de conejo anti humano conjugadas con fluoresceína. Observaron que la cantidad y distribución de

los cuerpos fluorescentes coincidía con la presencia de corpúsculos de Negri en la infección por el virus salvaje (Goldwasser y Kissling, 1958). Con los años, ésta técnica se utilizaría para el diagnóstico de la rabia.

En el año 1962 y, gracias al desarrollo de la microscopía electrónica, Seiichi Matsumoto encontró densas masas homogéneas en el citoplasma de neuronas de cerebros de ratones infectados con virus rábico salvaje. Estas estaban compuestas de agregados filamentosos en forma de matriz asociados con partículas alargadas de tipo bastón con un ancho de 120 nm y propuso que se debían a viriones rábicos (Matsumoto, 1962).

En el año 1965, Miyamoto y Matsumoto estudiaron la naturaleza de los corpúsculos de Negri, comparando tejidos cerebrales de ratones infectados con virus salvaje. Descubrieron que los corpúsculos de Negri correspondían a matriz citoplasmática, proporcionando evidencia de que están relacionados con la replicación viral (Miyamoto y Matsumoto, 1965).

En el año 1965, Johnson demostró la propagación secuencial del virus de la rabia en los huéspedes a lo largo del tiempo, proporcionando conocimiento sobre la patogénesis de muchas infecciones virales. Los resultados demostraron que el virus de la rabia es altamente neurotrópico y se propaga secuencialmente por el sistema nervioso, luego de ser inoculado por dos rutas diferentes. Un resultado trascendental fue que no se detectó virus en sangre o vísceras luego de la inoculación. Además, se previno el desarrollo de la enfermedad mediante la amputación de los pies o seccionamiento del

nervio ciático, demostrando que el virus de la rabia se propaga por una vía neuronal en el sistema nervioso periférico y central (Johnson, 1965).

En 1973, Murphy logró dilucidar el camino del virus desde que infecta hasta que alcanza el SNC (Murphy y col., 1973). Determinaron la presencia del virus sucesivamente en células musculares próximas al sitio de inoculación, hilos neuromusculares y neurotendinales cercanos, nervios periféricos, neuronas ganglionares de la raíz dorsal y axones, concluyendo que el virus de la rabia se disemina al SNC en el axoplasma de los nervios periféricos. Una vez establecida la infección en el SNC, encontraron partículas virales en el ojo y múltiples órganos (intestinos, médula suprarrenal, páncreas, tejido adiposo marrón, miocardio, papilas gustativas, epitelio olfatorio, glándulas salivares y terminaciones nerviosas asociadas). Esto indica la propagación neural periférica centrífuga de la infección viral (Murphy y col., 1973).

1.2.2 Epidemiología

La rabia es una enfermedad viral que causa una forma letal de encefalomielitis en seres humanos y animales susceptibles al virus del género *Lyssavirus*. La especie tipo del género es el virus de la rabia, que se encuentra distribuido en todo el mundo (figura 6), siendo mantenido en diversas especies de mamíferos dentro de los órdenes *Carnivora* y *Chiroptera*, mientras que los seres humanos no contribuyen al mantenimiento de los lyssavirus y se consideran huéspedes finales o sin salida. El número anual de muertes humanas en todo el mundo por rabia se estima en 59.000

(Hampson y col., 2015). La mayoría de ellas, ocurre en países subdesarrollados o en desarrollo, donde la rabia canina es endémica.



Figura 6. Distribución mundial del virus de la rabia, OMS 2015.

El *virus de la rabia (RABV)* representa al genotipo 1 (GT 1), históricamente serotipo 1 (ST 1), y está compuesto por un conjunto de virus relacionados capaces de iniciar una enfermedad neurológica fatal aguda en los mamíferos. Este grupo es responsable de la mayoría de las muertes por rabia de seres humanos y animales a lo largo de la historia. El término genotipo se ha aplicado a los lyssavirus ya que las técnicas moleculares reemplazaron al serotipado como método de clasificación (Bourhy y col., 1993).

El *virus del murciélago de Lagos (LBV)* representa al genotipo 2 (GT 2) y se encuentra en murciélagos pterópodos del África subsahariana con derrames infrecuentes en otras especies (Markotter y col., 2008).

El *virus Mokola (MOKV)* representa al genotipo 3 (GT 3) y su reservorio natural sigue siendo una incógnita; sin embargo, se han realizado aislamientos virales desde musarañas, gatos, perros, roedores y dos humanos en el África subsahariana (Sabeta y col., 2007).

El *virus Duvenhage (DUVV)* representa al genotipo 4 (GT 4) y ha sido aislado de murciélagos insectívoros y humanos, que murieron luego de mordeduras de murciélagos en el África subsahariana (Markotter y col., 2008).

El *lyssavirus del murciélago europeo de tipo 1 (EBLV1)* representa al genotipo 5 (GT 5) y su reservorio natural es el murciélago de Serotine (*Eptesicus serotinus*). Afecta a murciélagos insectívoros de Europa, con infecciones ocasionales de seres humanos (Fooks y col., 2003, Kuzmin y col., 2006).

El *lyssavirus del murciélago europeo de tipo 2 (EBLV2)* representa al genotipo 6 (GT 6), y ha sido aislado de murciélagos insectívoros del género *Myotis* y de humanos infectados tras mordedura de murciélago en el noroeste de Europa (Fooks y col., 2003). La muerte de un conservador escocés de murciélagos debido a la infección por *EBLV2* fue el primer caso de rabia adquirido en el Reino Unido en 100 años (Nathwani y col., 2003).

El *lyssavirus de murciélago australiano (ABLV)* representa al genotipo 7 (GT 7) y se describió por primera vez en 1996, diagnosticándose de la misma

manera que la rabia (Speare y col., 1997). Se evita con las vacunas tradicionales contra la rabia y resulta en una enfermedad humana fatal indistinguible de la rabia clásica. Sin embargo, Australia es considerada "libre de rabia" por la Organización Mundial de la Salud. El *lyssavirus de murciélago australiano* circula entre murciélagos insectívoros y pterópodos.

Las otras siete especies miembros del género *Lyssavirus* incluyen el *virus Aravan (ARAV)*, el *virus Khujand (KHUV)*, aislados cada uno de un murciélago insectívoro del género *Myotis* en Asia Central; el *virus de murciélago de Bokeloh (BBLV)*, aislado de un murciélago también del género *Myotis* pero en Alemania (Freuling y col., 2011); el *virus Irkut (IRKV)*, aislado de un murciélago insectívoro *Murina leucogaster* en Siberia; el *virus de murciélago caucásico del oeste (WCBV)*, aislado de un murciélago insectívoro *Miniopterus schreibersi* en el sureste de Europa; el *virus de murciélago Shimoni* (Kuzmin y col., 2010), aislado a partir del murciélago de Comerson (*Hipposideros commersoni*); y el *virus Ikoma (IKOV)*, aislado de civetas africana (*Civettictis civetta*) en Tanzania (Marston y col. , 2012). Nuevos lyssavirus siguen descubriéndose y generan nuevos desafíos. Sin embargo, el impacto en la mortalidad humana y animal de estos virus relacionados con la rabia, respecto de las especies del tipo RABV parece ser considerablemente menor. Salvo el virus de murciélago de Lagos (LBV), los restantes integrantes del género *Lyssavirus* han causado encefalomielitis en humanos similares a la rabia.

Las variantes del virus de la rabia pueden diferenciarse por sus características antigénicas, al ser medidas por patrones de unión diferencial con anticuerpos monoclonales y por variaciones en las sustituciones de nucleótidos en su cadena simple negativa (Rupprecht y col., 1987).

Dentro de las poblaciones que actúan de reservorio para una variante viral específica, el virus de la rabia afecta de forma desproporcionada a los individuos. La transmisión del virus ocurre fundamentalmente entre congéneres, pero también ocurre la transmisión cruzada hacia otras especies de mamíferos, que es dependiente de la interacción directa con individuos infectados de las especies que actúan de reservorio.

Desde el punto de vista epidemiológico, el virus de rabia se asemeja a una metapoblación donde las variantes genotípicas del virus se adaptan y mantienen en una o más especies de mamíferos, constituyendo el genotipo 1 del género *Lyssavirus*. La definición clásica de metapoblación es una población de subpoblaciones, unidas entre sí por movimientos ocasionales (Barbour y Pugliese, 2004). En el caso del virus de la rabia, los movimientos están representados por la transmisión cruzada de especies, denominado derrame, donde una variante viral se transmite a otra especie secundaria y luego se adapta mediante la transmisión sostenida, desarrollando modificaciones genotípicas y fenotípicas que indican su aparición como una nueva y única sub variante del virus de la rabia.

La epidemiología de la rabia humana y animal generalmente refleja las variantes virales terrestres mantenidas en los animales reservorio específicos

de cada región, y la posible interacción con otras especies de animales o humanos (Anderson y col., Feder y col., 2012). Aunque hay excepciones, ocasionadas por derrames de las variantes asociadas a murciélagos hacia otros animales y humanos (McQuiston y col., 2001), que son difíciles de correlacionar espacialmente con precisión debido a la ecología de las especies de murciélagos involucradas. Esto se suma a los casos importados ocurrientes tras la infección de un animal o humano en una región determinada, y su posterior traslado hacia otra locación donde no existe esa variante viral. De hecho, el traslado intencional de animales por el hombre puede ocasionar graves daños sanitarios. Ejemplos de esto son la translocación de mapaches responsables de una de las epizootias más importantes de rabia que se tenga registro (Nettles, 1979), y la translocación de coyotes en Florida desde Texas, que ocasionó la variante coyote/perro.

Estudios bioinformáticos sugieren que el origen de los virus rábicos que afectan a los carnívoros terrestres, tiene un ancestro común de un virus de murciélago (Badrane y Tordo, 2001).

Teniendo en cuenta que la rabia puede afectar a animales terrestres y aéreos, se distinguen un ciclo terrestre y otro aéreo para la circulación del virus (Figura 7).

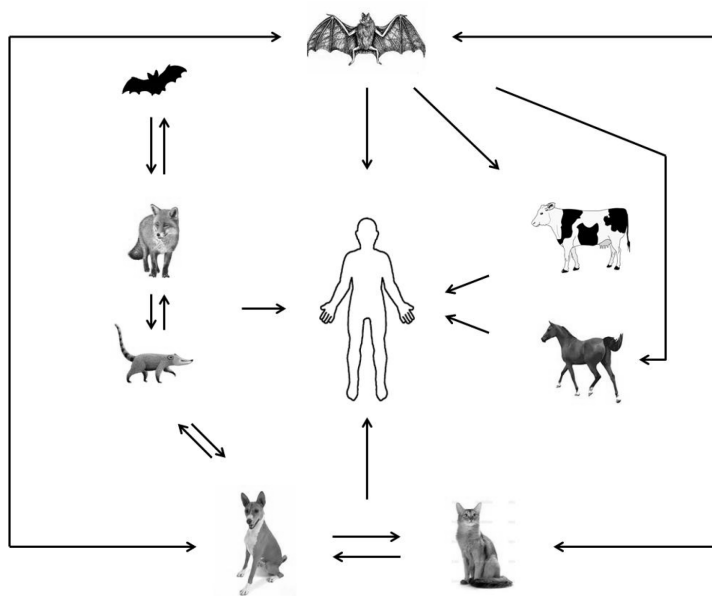


Figura 7. Ciclos aéreo y terrestre de la rabia.

El ciclo aéreo de la rabia involucra a murciélagos rabiosos. Dependiendo de la alimentación, se distinguen en murciélagos hematófagos y no hematófagos (insectívoros, frugívoros). Los murciélagos no hematófagos se encuentran distribuidos en ambientes salvajes y también en ciudades, por lo que la presencia de un murciélago caído conlleva un alto riesgo de contagio hacia los animales domésticos y el hombre. Los murciélagos hematófagos, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, se encuentran solamente en el continente americano. Éstos funcionan como transmisores de virus rábico hacia otros animales, produciendo rabia pasesiente en bovinos, equinos y ovinos, y esporádicamente en el hombre. La rabia pasesiente se encuentra difundida desde México hacia la zona central de Argentina, principalmente en zonas tropicales o subtropicales. En Argentina,

ocasiona una gran pérdida económica a los productores y requiere de millones de dosis anuales de vacunas.

En América Latina, la rabia sigue siendo un problema sin resolver. Prueba de ello es un informe publicado por el Departamento de Zoonosis Urbanas del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires del primer semestre del 2017. En Colombia, se ha informado un caso de rabia humana en la ciudad de Bogotá, debido a la mordedura de un felino rabioso, convirtiéndose en el segundo caso producido en 15 meses. En Bolivia, se han informado tres casos fatales de rabia humana en niños de 3, 11 y 14 años que habían tenido contacto con caninos y/o felinos en las ciudades Sacaba y Santa Cruz de la Sierra. Al 11 de Abril, en Bolivia se registraron 273 casos registrados de rabia en perros y gatos durante 2017, triplicando así al total de casos registrados en 2016. En Brasil, se han informado más de 40 ataques de murciélagos hematófagos, que se cobraron la vida de un hombre por contagio de rabia en la ciudad de Paramirim, en Salvador Bahía. En Perú, se confirmó un caso de rabia bovina a causa de mordedura por canino salvaje en el distrito de Coata. En Chile, se registraron 12 casos de rabia animal en la región del Biobío, en el primer semestre del 2017.

En el mismo período, en Argentina se detectaron varios focos de rabia parestante producidos por mordeduras de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en las provincias de Salta, Jujuy, Formosa, Chaco y Córdoba (Figura 8). En este ciclo aéreo/rural, se trasmite la variante 3 del virus rábico. Asimismo, se han detectado 19 casos positivos en murciélagos

insectívoros (*Tadarida brasiliensis* y *Myotis spp*), transmisores de la variante 4 del virus rábico en el ciclo aéreo urbano/rural. En la Provincia de Córdoba, en el mes de Abril, se confirmó rabia en un felino en la ciudad de Villa de Soto del departamento de Cruz del Eje, y en el mes de Mayo, un canino en la ciudad de Coronel Moldes del departamento Rio Cuarto (Figura 8). Ambos animales presentaron la variante antigénica 4 transmitida por murciélago. La rabia aérea es endémica y, según las estadísticas de Zoonosis Urbanas del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, la prevalencia anual de quirópteros insectívoros positivos a rabia, en esta provincia, es del 4,4 al 4,9% aproximadamente. Estudios anteriores en Argentina (Piñero y col., 2012), han mostrado una proporción de rabia en los murciélagos recibidos para el monitoreo nacional entre 3,1 y 5,4 %, dependiendo de la ubicación geográfica.



Figura 8. Distribución de la rabia en Argentina 2017 (Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires).

1.2.3 Patogenia

El virus rábico, al ser inoculado por vía subcutánea o intramuscular, como sucede naturalmente por una mordedura, se propaga desde el lugar de inoculación hacia el sistema nervioso central mediante los nervios periféricos (Figura 9). En estudios realizados en ratones inoculados en la región plantar con virus calle (virus aislado de un animal callejero), se pudo prevenir la rabia mediante la amputación de la pata inoculada hasta 18 días después de la exposición experimental (Baer y col., 1965). De manera similar, si se hace una neurectomía (extirpación de una parte de un nervio) de uno de los nervios regionales con anterioridad al sitio de inoculación con un virus fijo, se

previene el desarrollo de la enfermedad en un animal de laboratorio (Baer y col., 1968). En este lapso previo a la invasión neural, el virus se multiplica en los miocitos del lugar de la inoculación. La comprobación experimental de que el virus permanece un tiempo más o menos largo, sin propagarse en el lugar de la inoculación, es muy importante para el tratamiento post exposición. Este período, entre la inoculación del virus y la invasión neural, es quizás el único período en el que el tratamiento vacunal profiláctico posterior a la exposición puede dar resultados satisfactorios

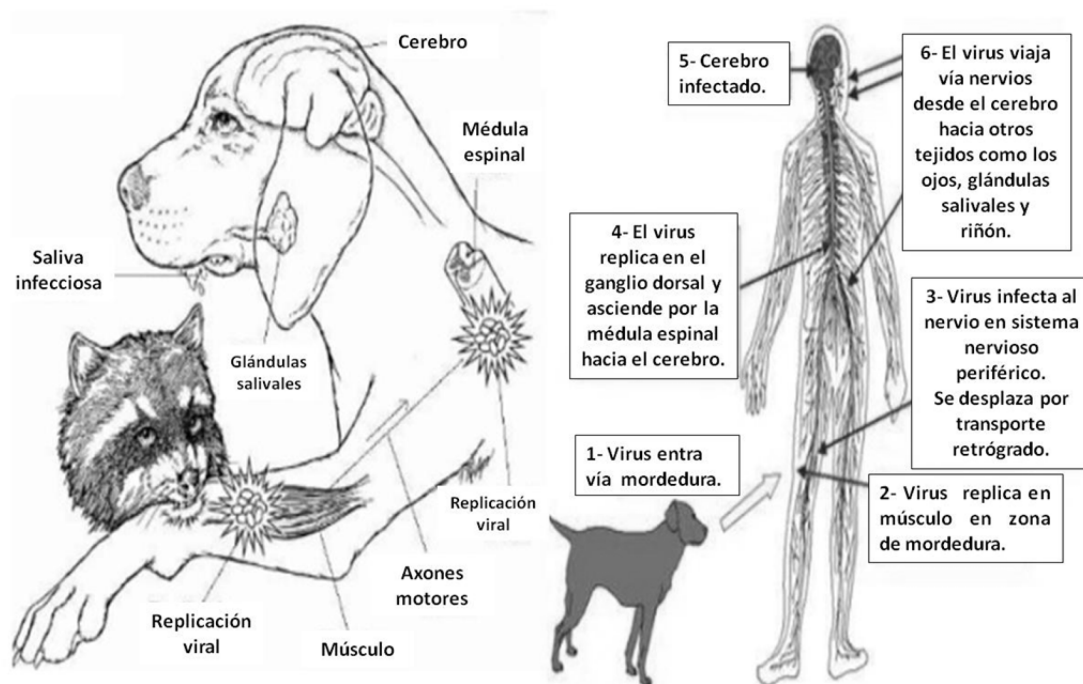


Figura 9. Patogenia del virus de la rabia en canino y humano.

A partir de que el virus infecta al sistema nervioso periférico, comienza a desplazarse por él, mediante transporte retrógrado, y, luego de infectar y

replicarse en el ganglio dorsal, asciende rápidamente por la médula espinal hasta llegar al cerebro. Una vez que se produce la infección del SNC, el virus se difunde por los nervios eferentes, en forma centrífuga, hacia las glándulas salivales, órganos y tejidos por medio de los nervios periféricos.

En las glándulas salivales, se han comprobado títulos víricos más altos que en el cerebro y, también, se han hallado títulos altos en los pulmones. Esto indicaría que el agente puede multiplicarse fuera del SNC. Se ha aislado o detectado virus en diferentes órganos y tejidos, tales como glándulas suprarrenales, grasa parda de los murciélagos, riñones, vejiga, ovarios, testículos, glándulas sebáceas, células germinativas de los bulbos pilosos, córnea, papilas de la lengua y pared intestinal.

La aparición del virus rábico en la saliva resulta de especial interés en la epidemiología, ya que la mordedura es el principal modo de transmitir la infección. En la mayoría de los casos, la eliminación por la saliva se inicia con el comienzo de la enfermedad, pero se ha comprobado la aparición del agente antes de que se manifestaran síntomas clínicos. En perros se pudo detectar experimentalmente el virus en la saliva de 1 a 13 días antes de manifestarse la enfermedad, dependiendo de la dosis y la cepa viral empleada. Dado que el virus puede excretarse por más de 10 días antes de la aparición de los signos, y este es el lapso recomendado para la observación de perros mordedores, se sugiere la conveniencia de extender dicho período. En gatos, se pudo comprobar la eliminación del virus por la saliva de 1 a 3 días antes de las manifestaciones clínicas, en bovinos de 1 a

2 días, en zorrinos hasta 14 días, mientras que en murciélagos hematófagos y no hematófagos el tiempo es indeterminado.

1.2.4 Signos clínicos

Los signos clínicos de la rabia en los animales varían dependiendo del efecto del virus en el cerebro. Los signos característicos incluyen cambios repentinos en el comportamiento y parálisis progresiva conducente a la muerte. En algunos casos, sin embargo, un animal puede morir rápidamente sin haber mostrado signos clínicos significativos. Existen dos comportamientos característicos en rabia animal, que son denominados rabia furiosa o paralítica.

En el caso de la rabia furiosa, los animales pueden estar ansiosos, altamente excitables y/o agresivos, con periodos intermitentes de depresión, con la pérdida de cautela y temor naturales hacia otros animales y humanos. Los animales con esta forma de rabia, suelen mostrar súbitos cambios del comportamiento y atacar sin provocación. Con el avance progresivo de la enfermedad, se observa debilidad muscular, pérdida de coordinación, convulsiones, desarrollo de parálisis progresiva. El cuadro evoluciona hacia la muerte del animal.

En la rabia paralítica, a veces denominada muda, los animales suelen mostrarse deprimidos o inusualmente dóciles. Es frecuente que desarrollen parálisis, generalmente de la cara, garganta y cuello, que se evidencia por expresiones faciales anormales, babeo excesivo e incapacidad para tragar.

Además, la parálisis puede afectar al cuerpo, primeramente, a las patas traseras, extendiéndose rápidamente a todo el cuerpo, con coma y muerte subsecuentes.

En los humanos, los primeros síntomas pueden incluir fiebre, dolor de cabeza y comezón en el sitio de la inoculación. Con el avance de la enfermedad, pueden aparecer otros síntomas como depresión, somnolencia, inquietud, confusión, agitación o parálisis de la cara, la garganta y el cuello. La parálisis progresiva suele conducir a la muerte.

Los murciélagos con rabia también tienen cambios en el comportamiento, a menudo pueden verse de día y estar caídos.

1.2.5 Diagnóstico

El rápido diagnóstico de la rabia en animales es esencial para la profilaxis posterior a la exposición. Dependiendo del estado del paciente, se puede llevar a cabo un diagnóstico ante o post mortem (Tabla 2). Existen diferentes métodos de diagnóstico. Estos varían en función si se detectan antígenos virales o anticuerpos específicos contra el virus (Manual de normas y procedimientos para la vigilancia, prevención y control de la rabia, Ministerio de Salud de Argentina, 2007).

Diagnóstico ante mortem: Utilizando una muestra de biopsia de piel (nuca), puede realizarse una inmunofluorescencia directa (IFD). Para ella, se utiliza un anticuerpo, marcado con un flúorocromo, que reacciona específicamente

con el antígeno de la nucleocápside del virus. El resultado de la reacción, se observa con un microscopio de fluorescencia. Un resultado positivo es indicativo de la rabia, pero un resultado negativo no descarta la posibilidad de infección. Si se emplea un panel de anticuerpos monoclonales anti nucleocápside del virus rábico, con la IFD puede realizarse tipificación antigénica (Rupprecht y col., 1987).

Para diagnosticar rabia, también pueden utilizarse muestras obtenidas de tejidos o de secreciones y fluidos biológicos tales como saliva, líquido cefalorraquídeo (LCR) o lágrimas.

El ensayo biológico tradicional es el método más sensible para detectar rabia, y consiste en inocular ratones intracerebralmente con las muestras obtenidas de pacientes. En caso de una muestra positiva, entre los 7 y 15 días, los ratones inoculados se enferman. Una vez que se observan signos de enfermedad, se puede detectar el antígeno rábico. Otra opción de ensayo biológico, es inocular cultivos celulares de neuroblastos y luego detectar la presencia de ARN viral, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR). Alternativamente, puede detectarse la presencia viral mediante inmunofluorescencia sobre las células inoculadas.

La RT-PCR es una técnica muy sensible que se basa en la detección del ARN viral. Sin embargo, pueden producirse resultados falsos positivos o falsos negativos, por lo que sólo se debe utilizar en combinación con otras técnicas convencionales. La RT-PCR se utiliza para clasificación viral.

Existen técnicas de diagnóstico que se basan en la detección de anticuerpos específicos al virus. Dentro de ellas se encuentran el ensayo de neutralización, el método rápido de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT) y el método enzimático ELISA.

El ensayo de neutralización en ratones para la determinación de anticuerpos presenta un alto grado de especificidad. Se realizan diluciones del suero a estudiar, se les añade una cantidad fija de virus estándar y se inoculan en ratones. Es un ensayo de serología básica, donde la falta de anticuerpos neutralizantes se manifiesta por la muerte o enfermedad del huésped. Presenta las desventajas de la demora en el resultado y el empleo de animales.

En el RIFFT, se incuban diluciones del suero a titular y un suero de referencia de título conocido, con una dosis fija de virus. Se añade una suspensión de células sensibles y, luego de una incubación, se observa al microscopio de fluorescencia. Teniendo en cuenta la disminución del título infeccioso, se puede calcular el título del suero desconocido por comparación con el suero de referencia. Es una técnica que tiene una sensibilidad equivalente al test de la seroneutralización, con la ventaja de que en un día ya se tiene el resultado.

El ELISA es una técnica que permite la detección de anticuerpos anti virus rábico en suero o plasma del hombre y animales. Este ensayo permite, en sólo 4 horas, calcular la concentración de anticuerpos de cada muestra desconocida.

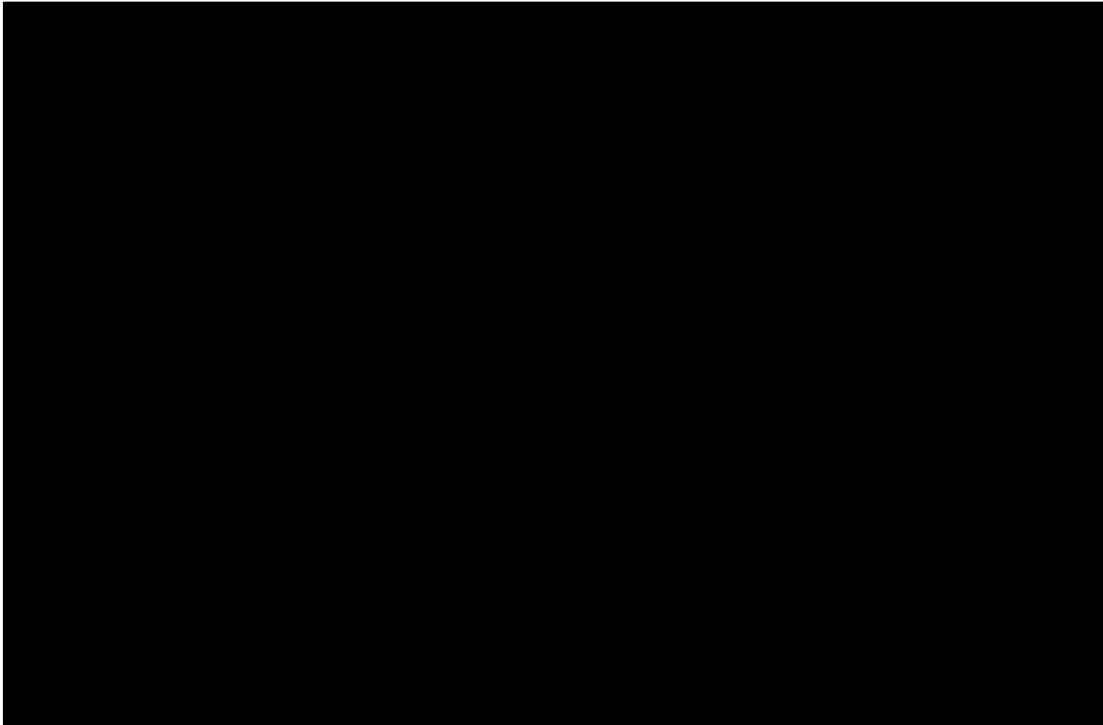


Tabla 2. Ensayos diagnósticos para rabia.

Diagnóstico post mortem: Las muestras preferidas en el diagnóstico post mortem son las provenientes de tejido cerebral. El ensayo más utilizado es la prueba de inmunofluorescencia en improntas de tejido cerebral. Este es el estándar de oro para el diagnóstico de la rabia. Puede ser necesario realizar un aislamiento del virus. Para ello es conveniente la inoculación en ratones de manera intracraneal o en cultivo celular de neuroblastos. Alternativamente, puede realizarse un ensayo molecular por RT-PCR, aunque no se recomienda en la actualidad para el diagnóstico post mortem.

1.2.6 Prevención

La rabia puede controlarse mediante programas de vacunación masiva de animales y la eliminación de animales callejeros. Esta estrategia es la más rentable para prevenir la rabia en el ser humano, debido a que no solo se reducen los fallecimientos por rabia, sino que también los tratamientos de profilaxis tras la exposición que reciben los pacientes que han sido lastimados por animales.

Un aspecto importante para un buen programa de profilaxis, es profundizar los conocimientos de la sociedad en materia de prevención y lucha contra la rabia. Fundamentalmente, sobre la responsabilidad que conlleva el tener una mascota, la prevención de las mordeduras y el modo de actuar cuando estas ocurren. El compromiso de la sociedad y su correcta participación en los programas preventivos contribuyen a mejorar los planes sanitarios. En el caso de la rabia, tener presente la obligatoriedad en la vacunación anual de los perros y gatos desde los tres meses durante toda la vida del animal, además de evitar que éstos salgan a la calle porque pueden atacar a personas u otros animales (o ser atacados) potencialmente rabiosos.

1.2.7 Vacunas antirrábicas

Existen diferentes vacunas de uso humano y veterinario disponibles para el tratamiento de la rabia. Ellas utilizan como agente inmunizante alguna de las cepas de virus rábico fijo. Dependiendo del sistema en el cual se realizan las vacunas se diferencian en vacunas antirrábicas de tejido nervioso, de cultivo celular y de embrión de pato.

Vacunas antirrábicas de tejido nervioso: Este tipo de vacunas son adaptaciones de la primera vacuna antirrábica desarrollada por Pasteur en 1885. Fuenzalida y Palacios en el año 1955 modificaron la técnica original reduciendo considerablemente los efectos adversos generados por la mielina presente en el tejido nervioso de animales adultos. El medio que se utiliza para obtener la multiplicación viral es el cerebro de ratón lactante de un día de vida. Es una vacuna trivalente inactivada que contiene las cepas de virus rábico CVS, 51 y 91. Se administra por vía subcutánea, preferentemente en regiones glúteas altas. Como efectos adversos, pueden manifestarse dolor, prurito, eritema, induración en la zona de inoculación. La inoculación parenteral de estos biológicos estimula la formación de anticuerpos anti mielina y podrían presentarse complicaciones como el Síndrome de Guillain Barré, la parálisis ascendente de Landry, y encefalitis desmielinizantes. De todos modos, los riesgos son extremadamente bajos, considerando el tipo de animales utilizados y la incorporación al protocolo de producción de procedimientos de purificación, que eliminan al máximo los restos de mielina. Este tipo de vacuna es utilizada en países en desarrollo, entre los que figura la Argentina, sobre todo en campañas para la vacunación masiva de animales. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud recomienda fuertemente su reemplazo por vacunas producidas en cultivos celulares (OMS, 2007).

Vacunas antirrábicas de cultivo celular

La gran mayoría de las vacunas antirrábicas comerciales son producidas en cultivo celular, utilizándose células Vero y BHK-21, preferentemente, para realizar la multiplicación del virus. Se administran por vía intramuscular, en la región deltoidea. Los efectos adversos observados son menores que en vacunas realizadas en tejido nervioso, aunque puede presentar efectos locales como dolor, eritema, pápula indurada, prurito local y adenopatías en la cadena ganglionar local, o generales como fiebre, astenia, adinamia y erupción. Se debe emplear con precaución en las personas que tienen antecedentes de hipersensibilidad a la neomicina, polimixina B y estreptomicina, ya que son constituyentes de la vacuna.

La vacuna comercial de uso humana más vendida es Verorab producida por la empresa Sanofi-Pasteur, realizada en células VERO con la cepa Pitman Moore (Frazatti-Gallina y col., 2004; Toovey, 2007). A nivel veterinario, hay mayor variedad y se utilizan mayormente células BHK-21 (Kallel y col., 2002; Kallel y col., 2003; Yang y col., 2013).

Vacunas antirrábicas producidas en embrión de pato:

El medio que se utiliza para producir la multiplicación viral de la cepa Pitman Moore son huevos embrionados de pato. El inóculo se propaga a través de 12 o 13 pasajes sucesivos y se inactiva con β -propiolactona. Se administra por vía intramuscular, en la región deltoidea. Se debe evitar la región glútea dado que se ha demostrado que tiene menos capacidad para producir

anticuerpos. Aunque es menos recomendable, también puede aplicarse por vía intradérmica. Puede producir efectos locales como eritema, induración y prurito.

1.2.8 Tratamiento

Existen dos tipos de tratamiento para rabia, dependiendo si se realiza antes o después de una posible exposición al virus, denominados tratamientos pre y post exposición, respectivamente.

En el caso de personas que tengan ocupaciones de alto riesgo de transmisión, se recomienda realizar un tratamiento preventivo o pre exposición (Tabla 3). Este grupo incluye al personal de laboratorios que trabajan con el virus de la rabia, personas que realizan actividades profesionales o personales en las que puedan tener contacto directo con murciélagos, animales carnívoros y otros mamíferos de zonas afectadas por la rabia. Asimismo, es recomendable vacunar a las personas que viajen a zonas donde la rabia es endémica y que vayan a pasar mucho tiempo realizando actividades al aire libre. Por último, resulta conveniente considerar la posibilidad de vacunar niños que residan o visiten zonas de alto riesgo, puesto que corren mayor riesgo de ser atacados ya que suelen jugar con los animales y pueden sufrir mordeduras graves, e incluso no decir que han sido mordidos o lamidos. Para ellos, hay vacunas antirrábicas que se pueden utilizar como inmunización anterior a la exposición (tabla 3).

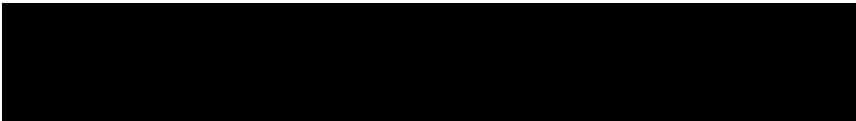


Tabla 3. Tratamiento pre exposición con vacunas producidas en cultivo celular (Warrel, 2012).

La profilaxis post exposición es el tratamiento inmediato después una mordedura o lamida de una herida, cuyo objetivo radica en impedir que la infección entre en el SNC, lo cual provocaría la muerte inmediata. En este caso, la atención se hace sobre la persona damnificada y también sobre el animal agresor. Inicialmente, se realiza la limpieza y tratamiento local de la herida. Para ello, se recomienda el lavado durante un mínimo de 15 minutos con agua y jabón, detergente, povidona yodada u otras sustancias que inactiven al virus. Dependiendo la gravedad del contacto con el animal presuntamente rabioso, se recomiendan medidas profilácticas diferenciales (Tabla 4). Paralelamente, se realiza el análisis sobre el animal agresor, en caso de que haya sido identificado y capturado.

Si el animal muestra signos característicos de rabia, se inicia el tratamiento, aunque se espera la confirmación por alguna prueba diagnóstica. En el caso que el animal no muestre signos característicos en el momento de la agresión, es necesario mantenerlo aislado y en observación durante al menos 10 días. Si en el transcurso de los 10 días el animal no muestra signos de rabia, la persona agredida no debe ser vacunada o, si ya se inició el tratamiento debido a la gravedad de las lesiones, debe ser suspendido.

Caso contrario, si el animal agresor desarrolla signos o muere durante la observación, debe confirmarse o descartarse por diagnóstico de rabia. Si el resultado es positivo, se realiza el tratamiento completo de la persona agredida.

En el caso que el animal o animales agresores no se puedan localizar, se asume que el animal es rabioso y se realiza el tratamiento profiláctico inmediatamente.

Diferente es el proceder para el caso de que los animales agresores sean silvestres como murciélagos, monos, o cualquier otro potencialmente rabioso. Como no ha sido bien estudiado el desarrollo de la enfermedad en ellos, no se hace el seguimiento del animal, sino que se realiza el sacrificio y posterior análisis de laboratorio. Mientras se esperan los resultados, se inicia el tratamiento.

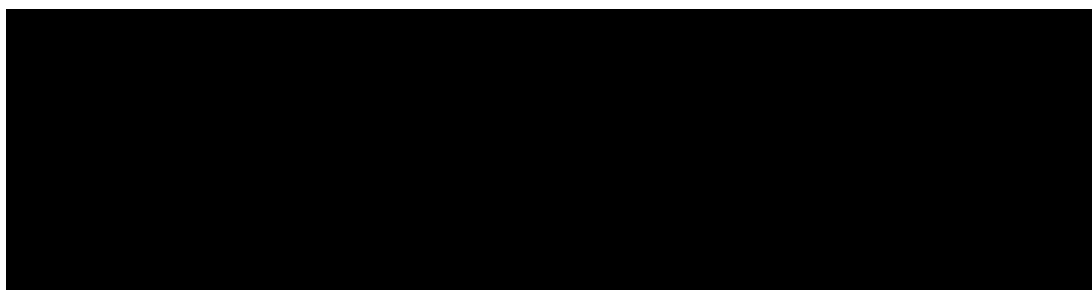


Tabla 4. Medidas profilácticas post exposición recomendadas (Jackson, 2011).

El plan de inmunización se lleva a cabo con una vacuna antirrábica potente y eficaz conforme a las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 5). En caso de estar indicado, la administración de inmunoglobulina

antirrábica puede llevarse a cabo. El tratamiento inmediatamente después de la exposición, es la única manera de evitar la aparición de los síntomas y la muerte consiguiente.



Tabla 5. Tratamiento post exposición con vacunas producidas en cultivo celular (Warrel, 2012).

1.2.9 Estudios en vacunas antirrábicas

La rabia es una de las enfermedades más estudiadas a lo largo de la historia. Desde la primera vacuna antirrábica efectiva (Pasteur, 1885) hasta la actualidad, numerosos científicos han dedicado sus estudios para desarrollar vacunas gracias al avance de la tecnología en producción.

Vacunas atenuadas: Se han realizado atenuaciones en cepas virales y se han probado como vacunas. Un ejemplo es la cepa SAD (Street-Alabama-Dufferin), que se utilizó como vacuna oral para la rabia silvestre en América del norte y Asia (Baer y col., 1971). Sin embargo, éstas vacunas han sido desaconsejadas por la OMS debido a los riesgos de su aplicación y su baja estabilidad térmica.

Vacunas a ADN: Como una alternativa más segura a las vacunas atenuadas, ya que no es necesaria mucha manipulación con el virus rábico y no existe riesgo de reversión, se desarrollaron vacunas a ADN donde el gen que codifica para la glicoproteína G fue clonado en un vector plasmídico y se inoculó en animales de experimentación. Dado que el gen debe expresarse en la célula hospedadora, se demoraba un tiempo en alcanzar un nivel lo suficientemente elevado como para generar inmunidad ante un desafío ante el virus fijo. Esta característica hizo a esta vacuna ineficaz en un tratamiento post exposición, debido a la rapidez de acción que se necesita para evitar el ingreso del virus en el SNC (Saxena y col., 2008).

Vacunas utilizando vectores virales: Numerosos estudios se han llevado a cabo para realizar vacunas utilizando diversos virus (fundamentalmente adenovirus y poxvirus), en los que el gen de la glicoproteína G se insertaba con técnicas de ADN recombinante (Henderson y col., 2009; Weyer y col., 2009). Si bien se pueden obtener resultados satisfactorios en cuanto a la estimulación de una respuesta inmune protectora, la presencia de anticuerpos neutralizantes endógenos contra estos virus en el ser humano reduce drásticamente la respuesta inmune. De todos modos, vacunas antirrábicas de este estilo han sido aprobados para su comercialización pero solo para rabia silvestre, mayormente en Norteamérica.

Vacunas producidas en plantas: Diversos grupos han llevado a cabo experimentos en plantas, con la finalidad de producir una vacuna que se administre por la vía oral. Para tal objetivo, la glicoproteína G ha sido expresada en variedades de tomate, maíz, espinaca y tabaco (Tiwari y col, 2009). Estos presentaron resultados satisfactorios a la hora de generar una respuesta inmune protectora en ratones y en el nivel de glicosilación logrado. Sin embargo, restan solucionar algunas cuestiones como la estabilidad en los rendimientos obtenidos entre generaciones.

Vacunas a partir de partículas pseudovirales: Otro tipo de vacuna recombinante que ha tomado atención en los últimos años es la basada en el uso de partículas pseudovirales, conocidas como VLPs (del inglés *virus-like particles*), para transportar inmunógenos. Si bien este tipo de vacunas tiene sus propios desafíos, estas estructuras ya han arrojado resultados satisfactorios en diversos estudios y constituyen una alternativa segura, dentro del campo de vacunas antirrábicas de nueva tecnología. Las VLPs son buenos candidatos vacunales, ya que son capaces de generar una potente y equilibrada respuesta inmune y, al ser partículas que no contienen genoma viral, son bioseguras (Fontana y col., 2014).

Vacunas a subunidades biológicas

La producción de vacunas a subunidades biológicas para el virus de la rabia ha sido, y sigue siéndolo, objetivo en el desarrollo de vacunas para varios

grupos de trabajo. Esto se debe a los beneficios que estas tienen respecto al nivel de bioseguridad necesario, además de disminuir el riesgo de infección para las personas que trabajan con un virus altamente mortal. Dado que la rabia afecta a países en vías de desarrollo o subdesarrollados, la búsqueda de vacunas que sean económicas, potentes, y eficaces (Wunner y col., 1983) es muy importante. Se ha trabajado en la expresión de genes de lyssavirus en una amplia variedad de microorganismos, que incluyen bacterias, levaduras, baculovirus, herpesvirus, paramixovirus y virus de plantas (Ge et al., 2011). Se han obtenido resultados satisfactorios en numerosos estudios, dónde se demuestra que se logran proteínas inmunogénicas capaces de proteger contra el desafío del virus de la rabia en ensayos de laboratorio. Sin embargo, resulta necesario seguir trabajando en este campo en el marco del desarrollo de vacunas antirrábicas que sean comerciáveis y eficaces.

1.3 Expresión de proteínas recombinantes

1.3.1 Expresión en Bacterias

Los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes son las bacterias. La especie más utilizada por excelencia es *Escherichia coli* (*E. coli*), aunque se usan otras, por ejemplo especies Gram-positivas del género *Bacillus*. *E. coli* es uno de los microorganismos más estudiados, su genética es bien conocida, son muy sencillas de manipular, tienen una tasa de crecimiento elevada en medios mínimos, con escasos requerimientos nutricionales y en la actualidad existe una gran disponibilidad

de cepas y vectores, especialmente desarrollados para aumentar los niveles de expresión (que pueden alcanzar hasta un 30% de las proteínas totales). Estas características, hacen que sea una de las primeras posibilidades que se tenga en cuenta cuando se desea expresar proteínas recombinantes (Lee, 1996).

Los sistemas bacterianos son ideales para producir proteínas de pequeño tamaño que no requieran modificaciones post traduccionales. Al ser organismos procariotas, no son idóneas para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores. Algunas proteínas a menudo muestran plegamientos complejos que incluyen muchos puentes disulfuro o que necesitan la intervención de chaperonas celulares en el plegamiento, características no presentes en los procariotas. Además, muchas de estas proteínas requieren para su función la inclusión de modificaciones tras su síntesis, que no pueden llevarse a cabo en organismos procariotas. Un ejemplo de ello es la glicosilación, esencial para la función de muchas proteínas eucariotas. Un efecto colateral, experimentado por las bacterias cuando son forzadas a producir una proteína a concentraciones elevadas, es la generación de cuerpos de inclusión, que no son más que agregados citoplasmáticos insolubles de dicha proteína. Las proteínas que forman los cuerpos de inclusión pueden ser inactivas o mostrar artefactos estructurales, como puentes disulfuro no nativos, tanto intra como intermoleculares y cisteínas libres no habituales. Para estos casos se han desarrollado métodos de procesamiento de cuerpos de inclusión, con el fin

de aislarlos, solubilizarlos con agentes desnaturalizantes, eliminar los puentes disulfuro y renaturalizar la proteína a su forma activa. Como alternativa, se han desarrollado también aproximaciones para reducir la producción de cuerpos de inclusión, que incluyen el direccionamiento de la proteína hacia el espacio periplásmico y el crecimiento de las bacterias a temperaturas inferiores a las estándar.

Los sistemas de expresión inducibles, como en el caso del vector comercial elegido para el desarrollo de este trabajo (pQE30), ya han sido extensamente utilizados para la obtención de proteínas recombinantes a mediana o gran escala (Studier y col., 1990). Este vector en particular, también presenta la posibilidad de obtener la proteína fusionada a una secuencia de 6 histidinas consecutivas (His-tag), que facilita la recuperación del producto por medio de una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

Los sistemas de expresión en bacterias han sido estudiados para la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia, obteniéndose una proteína insoluble que no resultó inmunogénica (Yelverton y col., 1983). Por su parte, para la nucleoproteína N no hay reportes que al producirse en bacterias se altere su inmunogenicidad.

1.3.2 Expresión en Levaduras.

Las levaduras presentan muchas de las ventajas de las bacterias, en cuanto a crecimiento (alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, productividad, crecimiento en medios baratos y

químicamente definidos). Pero además, como son eucariotas, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. La adición de una secuencia señal en el gen, permite la excreción de la proteína al medio de cultivo.

Algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), tienen una larga historia de utilidad en procesos de fermentación industrial. De hecho, se la viene utilizando hace miles de años para la elaboración de bebidas y productos de panificación, lo que la hace aceptablemente segura para el ser humano. Además, debido a tantos años de uso en investigación, se cuenta con un amplio conocimiento sobre su fisiología y su genética. Sin embargo, *S. cerevisiae* no siempre demostró ser el medio ideal para la producción de proteínas recombinantes. Si bien se han logrado grandes éxitos en la expresión de proteínas utilizando este sistema, existen una serie de problemas que dificultan el escalado de la producción a niveles industriales. En algunos casos, la proteína producida presentó un patrón de glicosilación diferente al de la proteína *wild type*. También, se han observado fenómenos de hiperglicosilación con oligosacáridos que contienen más de 100 residuos de manosa (las proteínas naturales no suelen contener más de 10 moléculas de manosa por cada aminoácido modificado). A veces, la proteína, en vez de secretarse se quedaba en el espacio periplásmico lo que dificultaba su purificación.

Estas dificultades han llevado al estudio de otros sistemas de expresión basados en levaduras, como *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). La levadura metilotrófica ascomicética *P. pastoris* es la alternativa más desarrollada para la expresión de proteínas foráneas, ya que es capaz de realizar mejores modificaciones post traduccionales que las producidas por *S. cerevisiae* a nivel del procesamiento proteolítico, la glicosilación y la formación de puentes disulfuro. *P. pastoris* se ha usado desde 1984 para producir proteínas recombinantes, y, en la actualidad, existen sistemas comerciales que brindan la posibilidad de controlar la expresión del gen de interés por medio de promotores inducidos por metanol. Este sistema está basado en el promotor de uno de los genes de la enzima alcohol oxidasa, que cataliza la primera reacción de la ruta de degradación del metanol en el peroxisoma de la célula. La enzima alcohol oxidasa tiene poca afinidad por el metanol, pero esto es compensado por la levadura sintetizando grandes cantidades de la enzima, codificada por dos genes (*aox1* y *aox2*). El producto del primero, representa más del 90% de la actividad total y su promotor está fuertemente regulado e inducido por la presencia de metanol y, a la vez, reprimido en otras condiciones (por ejemplo, bajos niveles de fuente de carbono). Las proteínas expresadas bajo el control de este promotor, pueden llegar a niveles superiores al 5% de la proteína total soluble luego de la inducción con metanol. Por lo tanto, este promotor permite una expresión controlada de genes heterólogos y la posibilidad de cultivar la levadura recombinante

durante la mayor parte del tiempo en una fuente de carbono no inductora, como la glucosa o el glicerol, hasta alcanzar una gran densidad. Todo esto, unido a altos rendimientos de la proteína obtenida y muy altos niveles de secreción de proteína de interés con escasa secreción de proteínas nativas, que facilita el escalado, han convertido a los procedimientos de obtención de proteínas basados en *P. pastoris* en uno de los sistemas más fácilmente escalable, más baratos y más rápidos de los desarrollados hasta el momento.

Este sistema, disponible comercialmente y de fácil uso, ha permitido expresar más de 400 tipos de proteínas, algunos ejemplos son la endostatina humana, la proteína de tela de araña y la producción del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B entre otros. Otra de las ventajas de los organismos metilótrofos es que al crecer en soluciones de metanol, pueden eliminarse virtualmente otros microorganismos competidores o contaminantes. Por último, presentan la posibilidad de integrar múltiples copias del vector en su genoma, dando lugar a transformantes estables.

Muy pocos grupos trabajan con *P. pastoris* en la producción de la glicoproteína G del virus de la rabia (Ben Azoun y col., 2017; Nagesha y col., 2010) con resultados preliminares satisfactorios, pero hasta la fecha no se han realizado desarrollos de vacunas.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

La expresión de las proteínas G y N en un sistema heterólogo, facilitará la obtención de grandes cantidades de antígeno y eliminará las desventajas del método actual de producción.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos generales

- Estudiar la producción de la glicoproteína G y de la nucleoproteína N del virus de la rabia, en el marco del desarrollo de una vacuna para la profilaxis de esta enfermedad.
- Analizar la utilidad de los sistemas heterólogos para la producción de proteínas del virus rábico.

2.2.2 Objetivos específicos

- Clonar la glicoproteína G y la nucleoproteína N del virus de la rabia en sistemas heterólogos.
- Expresar la glicoproteína G en un sistema de levadura.
- Expresar la nucleoproteína N en un sistema bacteriano.
- Optimizar la expresión de las proteínas en sistemas batch alimentado mediante el correcto diseño de las condiciones de alimentación/inducción.
- Establecer una estrategia adecuada para la recuperación de las proteínas a partir de cada uno de los sistemas de expresión utilizados.

- Estudiar la influencia del escalado sobre la producción de las proteínas recombinantes.
- Estudiar la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes en modelos animales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Cepas Bacterianas

TOP10F' (Invitrogen): Cepa de clonado de *E. coli*. Utilizada para la transformación con los vectores pCR2.1-TOPO y pPIC9 (ambos Invitrogen). Genotipo: F'{*proAB*, *lacIq*, *lacZ*ΔM15, Tn10 (TetR)}, *deoR*, *recA1*, *araD139*, *gal*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG* λ-Δ(*ara-leu*)7697 *mcrA*, Δ(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), φ80/*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*.

M15 (Qiagen): Cepa de clonado y expresión de *E. coli*. Utilizada para la transformación con el vector pQE-30 UA (Qiagen). Genotipo: F⁻, φ80Δ*lacM15*, *thi*, *lac*⁻, *mtl*⁻, *recA*⁺, KmR.

3.1.2 Cepa de levadura

GS115 (Invitrogen): Cepa para expresión de proteínas de *P. pastoris*, genotipo: *his4*. Fenotipo: Mut⁺ His⁻. La cepa *wild type* (wt) puede crecer tanto en medios ricos como en medios mínimos suplementados con histidina, utilizando metanol como fuente de carbono y energía.

3.1.3 Virus

CVS: Cepa vacunal inactivada del virus de la rabia, provista por el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata. Utilizada para la extracción del ARN viral.

3.1.4 Vectores de clonado y expresión

pQE-30 UA: Utilizado para el clonado y la expresión de la nucleoproteína N en *E. coli* (Figura 10). Está diseñado para la clonación directa de productos de PCR, ya que al ser linealizado presenta un residuo libre de timina en cada extremo 3'.

Dentro de sus 3,5 Kb de longitud, contiene la secuencia del promotor del bacteriófago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*), dos secuencias del operador lac (aumentan la unión del represor lac y aseguran una represión eficaz del promotor T5), un sitio de unión ribosomal sintético (incrementa la tasa de traducción), la secuencia de codificación de un *tag* de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal (facilita la purificación), los terminadores transcripcionales fuertes t0 del fago lambda y T1 del operón *rrnB* de *E. coli* (aseguran la estabilidad del transcripto), y el origen de replicación ColE1. Además, el plásmido contiene el gen de la β -lactamasa (*bla*), que confiere resistencia a la ampicilina (Sutcliffe, 1979). Las bacterias que incorporen al vector serán capaces de crecer en un medio con ampicilina.

kanamicina y ampicilina, respectivamente, y sitios de unión para *primers* universales de M13, que permiten verificar la presencia del inserto.



Figura 11. Vector de clonado pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

pPIC9: Utilizado para la expresión de la glicoproteína G en *P. pastoris* (Figura 12). Posee un péptido señal, derivado del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, que al ser fusionado al gen de interés permite la secreción de la proteína al medio extracelular.

El plásmido contiene el promotor (inducible por metanol) y el terminador del gen *aox1* de la enzima alcohol oxidasa. Presenta el origen de replicación del plásmido PBR322, que permite la duplicación del vector en bacterias que pueden ser seleccionadas por resistencia a ampicilina.

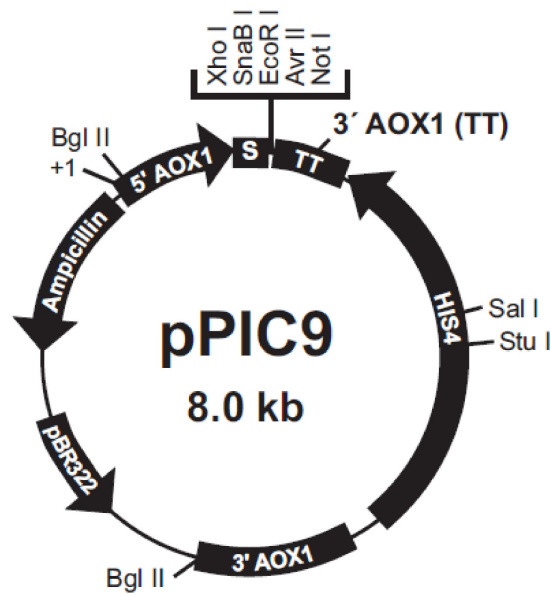


Figura 12. Vector de expresión pPIC9 (Invitrogen).

Al transformar las cepas de *P. pastoris* GS115 con este plásmido linealizado, se produce una inserción del tipo Ω , que ocasiona el reemplazo del gen *aox1* de la levadura. De esta manera, el gen de interés se inserta en el genoma y su expresión se induce por la presencia de metanol en el medio de cultivo. Durante el evento de recombinación, el genoma de la levadura también adquiere el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*), que le confiere el fenotipo His⁺, y permite la selección de las colonias recombinantes en placas de medio mínimo sin histidina.

3.1.5 Medios de cultivo

Placas de medio Luria Bertani (LB): Utilizadas para el screening de las colonias de *E. coli* transformadas con los vectores pQE-30-N, pCR2.1-TOPO-G y pPIC9-G.

- Composición:

Triptona	10 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
Cloruro de sodio	10 g/l
Bacto-ágar	15 g/l

Autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar antes de plaquear:

- Para la transformación de *E. coli* con pQE-30-N

Ampicilina	100 µg/ml
Kanamicina	25 µg/ml

- Para la transformación de *E. coli* con pCR2.1-TOPO-G:

Ampicilina	100 µg/ml
X-Gal	200 µg/ml
IPTG	40 µg/ml

- Para la transformación de *E. coli* con pPIC9-G:

Ampicilina	100 µg/ml
------------	-----------

Medio LB líquido con ampicilina y kanamicina (LB Amp Kan): Utilizado para la expresión de la nucleoproteína N en *E. coli*.

- Composición:

Triptona	10 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
Cloruro de sodio	10 g/l

Autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

Ampicilina	100 µg/ml
Kanamicina	25 µg/ml

Medio líquido *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC): Utilizado para la regeneración de las células electrocompetentes de *E. coli* luego de la electroporación.

- Composición:

Triptona	20 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucosa	20 mM

Autoclavar a 121 °C durante 20 min.

Placas de medio *minimal dextrose* (MD): Utilizadas para la transformación de la levadura de *P. pastoris*.

- Composición:

Glucosa	20 g/l
Base nitrogenada para levaduras (YNB)	13,4 g/l
Bacto-ágar	15 g/l

Autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

Biotina	0,4 mg/l
---------	----------

Placas de medio mínimo con metanol (MM): Utilizadas para seleccionar los clones de *P. pastoris* con fenotipo Mut^{+/S}.

- Composición:

Base nitrogenada para levaduras (YNB)	13,4 g/l
Bacto-ágar	15 g/l

Autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

Biotina	0,4 mg/l
Metanol	5 ml/l

Medio *yeast extract peptone dextrose* (YPD): Utilizado para el crecimiento y almacenamiento de la levadura *P. pastoris*.

- Composición:

Extracto de levadura	10 g/l
Peptona	20 g/l

Glucosa	20 g/l
---------	--------

Autoclavar a 121 °C durante 20 min.

Medio *buffered glycerol media* (BMG): Utilizado para el crecimiento de la levadura *P. pastoris*.

- Composición:

Base nitrogenada para levaduras	13,4 g/l
K ₂ HPO ₄	2,3 g/l
KH ₂ PO ₄	11,8 g/l
Glicerol	10 g/l

Ajustar el pH en 6,0 y autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

Biotina	0,4 mg/l
---------	----------

Medio *buffered methanol media* (BMM): Utilizado para la expresión de la glicoproteína G en la levadura *P. pastoris*.

- Composición:

Base nitrogenada para levaduras	13,4 g/l
K ₂ HPO ₄	2,3 g/l
KH ₂ PO ₄	11,8 g/l

Ajustar el pH en 6,0 y autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

Metanol	5 ml/l
---------	--------

Biotina	0,4 mg/l
---------	----------

Medio sintético (MS): Utilizado para los ensayos de escalado en la expresión de la glicoproteína G en la levadura *P. pastoris*.

- Composición:

Glicerol	32 g/L
KH ₂ PO ₄	20 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	15,7 g/L

Ajustar el pH en 6,0 y autoclavar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta 55 °C y agregar:

- 1 ml por litro de medio de solución de vitaminas 1000X conteniendo:

Biotina	0,002 g/l
Pantotenato de calcio	0,4 g/l
Ácido fólico	0,002 g/l
Niacina	0,4 g/l
Ácido p-aminobenzoico	0,2 g/l
Piridoxina (HCl)	0,4 g/l
Riboflavina	0,2 g/l
Tiamina (HCl)	0,4 g/l
Inositol	2 g/l

- 1 ml por litro de medio de solución de elementos traza 1000X
conteniendo:

Ácido bórico	0,05 g/L
Sulfato de cobre	0,004 g/l
Ioduro de potasio	0,01 g/l
Cloruro férrico	0,02 g/l
Sulfato de manganeso	0,04 g/l
Molibdato de sodio	0,02 g/l
Sulfato de zinc	0,04 g/l

3.1.6 Anticuerpos

Para detectar la presencia de la nucleoproteína N y de la glicoproteína G en los ensayos de western blot, se produjeron anticuerpos policlonales anti rabia en conejo. Utilizando una vacuna antirrábica de uso veterinario, producida por el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en cerebro de ratones lactantes, se realizó un protocolo de inmunización en un conejo albino a los días 0, 7 y 14 con 1 ml de vacuna inoculada por vía subcutánea. En la primera y segunda inoculación, se utilizó adyuvante de Freund completo e incompleto, respectivamente, mientras que en la tercera inoculación se inoculó solamente la vacuna. A los 21 días, se realizó el sangrado a blanco del animal para extraer el suero.

Como anticuerpo primario, también se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra la glicoproteína G del virus de la rabia provisto por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Universidad Nacional del Litoral.

Como anticuerpos secundarios, se utilizaron dos producidos en cabra Anti-IgG de conejo (Sigma cat. A9044) y Anti-IgG de ratón (Sigma cat. A9044), ambos conjugados con la peroxidasa del rábano picante.

3.1.7 Animales de Experimentación

Para el ensayo de potencia se emplearon ratones CF-1 libres de patógenos, de 4 a 5 semanas, provistos por el bioterio del Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata.

Para el ensayo de detección cualitativa de anticuerpos anti-G y anti-N rábicas, se utilizaron 6 ratones BALB/c libres de patógenos, de 4 a 5 semanas, cedidos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Para producir anticuerpos anti rabia, se utilizó un conejo albino, cedido por la cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Los procedimientos experimentales que se desarrollaron en el presente trabajo, están de acuerdo con las normativas internacionales (*Institute of Laboratory Animal Resources*, 1996), y fueron supervisados por el Comité Institucional de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la

Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (Exp.600-004104/08-001. Res. 129/09).

3.2 MÉTODOS GENERALES

3.2.1 Cultivos celulares en pequeña escala

Cultivos bacterianos: Para el crecimiento en escala pequeña de las diferentes cepas de bacterias se realizaron cultivos líquidos, de hasta 100 ml, con una agitación de 100 rpm a 37 °C con medio LB. Para mantener la presión selectiva en el caso de las bacterias recombinantes se utilizaron los antibióticos ampicilina y kanamicina (uno sólo o ambos dependiendo de la cepa y plásmidos) en concentraciones finales de 100 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente.

El mantenimiento de las cepas bacterianas y clones recombinantes a corto plazo, se realizó en placas de LB (sin y con antibiótico/s dependiendo de la cepa y plásmidos) a 4° C durante un período máximo de un mes. En tanto, el mantenimiento a largo plazo se hizo a partir de cultivos líquidos a los que se les añadió glicerol estéril hasta una concentración final de 15 % y se los almacenó a -70 °C.

Cultivos de levaduras: Para el crecimiento en escala pequeña de las levaduras se realizaron cultivos líquidos, de hasta 100 ml, con una agitación de 100 rpm a 28 °C. Dependiendo el tipo de ensayo, se utilizaron los medios YPD, BMG, BMM y MS. El mantenimiento de las levaduras y clones

recombinantes a corto plazo se realizó en placas con los mismos medios a 4 °C durante un período máximo de un mes. En tanto, el mantenimiento a largo plazo se hizo a partir de cultivos líquidos a los que se les añadió glicerol estéril hasta una concentración final de 15 % y se los almacenó a -70 °C.

3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen total de 25 µl en tubos de pared delgada de 200 µl. La mezcla de reacción que se utilizó fue siempre la misma, variando únicamente en el molde y *primers* utilizados (Tabla 6). A lo largo del trabajo se han utilizado 4 pares de *primers* para los distintos ensayos (Tabla 7).

Reactivo	Volumen	Concentración final
Molde	variable	100-1000 ng
<i>Primer forward</i> 10 mM	1 µl	0,4 µM
<i>Primer reverse</i> 10 mM	1 µl	0,4 µM
MgCl ₂ 25mM	1 µl	1 mM
<i>Buffer</i> PCR 10X	1 µl	1X
dNTPmix (8 mM c/u)	0,5 µl	200 µM
Taq-DNApol (5 UI/µl)	0,125 µl	0,625 UI
Agua	c.s.p. 25 µl	-
Total	25 µl	-

Tabla 6. Mezcla de reacción general de PCR.

Para que los resultados de las reacciones de la PCR sean consistentes, en cada una de las reacciones realizadas se añadió un control negativo y, en caso de tener el molde necesario, uno positivo. Los controles negativos

consistieron en un tubo adicional con todos los componentes necesarios para la PCR menos un molde y sirvieron como controles de contaminación, y para confirmar que los resultados positivos se deben a la presencia del ácido nucleico que se desea amplificar. En tanto los controles positivos consistieron en un tubo adicional conteniendo al segmento de ácido nucleico que se deseaba amplificar y sirvieron para comprobar que las condiciones de la reacción eran las adecuadas.

Primer	Secuencia	T _{ann}	Uso
NBacF	5'GTCTCGAGGATCCATGGATGCCGACAA 3'	55 °C	Amplificación gen de la nucleoproteína. Clonado en pQE-30
NBacR	5' CGGAAGCTTATGAGTCACTCGAATATG 3'		
GLevF	5'ATGTCGACAAAAGAATGGTTCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACC 3'	58 °C	Amplificación gen de la glicoproteína. Clonado en pCRTOP02.1
GLevR	5'ATGAATTCTCACAGTCCGGTCTCACCCCGCTCTTG 3'		
M13F	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'	55 °C	Chequeo del vector pCRTOP02.1.
M13R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'		
Secuenciación F	5' CGGATAACAATTTACACAG 3'	54 °C	Secuenciación de la nucleoproteína
Secuenciación R	5' GGTCATTACTGGAGTCTTG 3'		
5'AOX1	5' GACTGGTCCAATTGACAAGC 3'	57 °C	Chequeo del vector pPIC9. Secuenciación de la glicoproteína.
3'AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGCATCC 3'		

Tabla 7. *Primers* utilizados.

Se han utilizado diferentes fuentes de molde para las reacciones. Éstas han provenido de productos purificados de PCR previamente realizadas, de ADN plasmídico aislado de cultivos bacterianos, de una suspensión conteniendo partículas virales, o de colonias frescas de bacterias o levaduras (ensayo denominado *colony*-PCR).

El ciclado fue llevado a cabo utilizando un termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf). Los productos de PCR fueron utilizados inmediatamente luego del ciclado o conservados a -20 °C hasta su uso.

Para realizar los ensayos de *colony*-PCR a partir de las colonias bacterianas, se preparó la mezcla de reacción de PCR con todos los reactivos necesarios (menos el molde) y se llevó al volumen final de reacción de 25 μ l. A continuación, y en condiciones de esterilidad bajo cabina de flujo laminar, cada una de las colonias bacterianas a analizar fue suavemente picada con un ansa estéril, introducida en cada uno de los tubos de reacción de PCR y resuspendida mediante agitación suave. Teniendo en cuenta la sensibilidad de las bacterias de *E. coli* a la temperatura, se asume que durante la etapa de desnaturalización inicial a 95 °C de la PCR se produce la ruptura de las bacterias, permitiendo la liberación del ADN plasmídico que puede ser utilizado como molde de la reacción.

Para realizar los ensayos de *colony*-PCR a partir de las colonias de levadura, hay que realizar un procedimiento previo de ruptura de las mismas, debido a que presentan más resistencia a la ruptura celular que las bacterias. Para ello, se realiza un cultivo *overnight* en 600 μ l de medio YPD picando cada colonia que se quiere analizar. A continuación, se centrifuga a 16000 x g durante 2 minutos y se descarta el sobrenadante. El pellet de levaduras es resuspendido en una solución 1 % en SDS y 200 mM en LiCl, y se incuba a 70 °C durante 15 minutos. Luego, se coloca a -70 °C durante 5 minutos, se centrifuga a 8000 x g durante 2 minutos y se deposita el sobrenadante en un tubo limpio. Posteriormente, se agregan 300 μ l de etanol absoluto y se centrifuga a 16000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Por último, se descarta el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 100 μ l de agua estéril libre de

nucleasas. Como molde en las reacciones de PCR se utilizan 5 µl de esta solución.

3.2.3 Transformación de bacterias competentes

Para obtener las distintas cepas de *E. coli* electrocompetentes, se inocularon 5 ml de medio LB con 100 µl de un cultivo stock almacenado a -70 °C de la bacteria correspondiente y se dejó crecer *overnight* a 37 °C y 100 rpm. Al día siguiente, 500 ml de medio LB fresco fueron inoculados con los 5 ml del cultivo *overnight* y se dejaron crecer a 37 °C y 100 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,5 y 0,7. Luego de incubar a 0 °C durante 20 minutos, para detener el crecimiento bacteriano, se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Para disminuir la concentración salina del entorno de las células, se realizaron sucesivos lavados de las bacterias resuspendiéndolas suavemente en una solución fría de glicerol al 10 %, centrifugándolas a 4000 x g durante 15 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Secuencialmente, se utilizaron los volúmenes 500 ml, 250 ml, 20 ml de la solución de glicerol al 10 %. Luego de la última centrifugación y descartar el sobrenadante, las bacterias eléctricamente competentes fueron resuspendidas en 1 ml de la solución de glicerol al 10 % y utilizadas en el momento para la transformación o almacenadas en alícuotas de 100 µl con durante seis meses a -70 °C.

Para realizar la transformación de las bacterias mediante electroporación se trabajó en esterilidad. Las células, ADN a transformar, microtubos de

polipropileno de 1,5 ml y cubetas a utilizar se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. En un microtubo, se mezclaron 40 μ l de bacterias de *E. coli* electrocompetentes con 1-2 μ l de cada uno de los ADN plasmídicos a transformar (estériles, purificados y libres de sales) y se dejaron en hielo durante 1 minuto. A continuación, la mezcla fue introducida en la cubeta y colocada en el equipo *Micropulser Electroporation Appartus* (Biorad), dónde se le aplicó un pulso de 1,8 kV durante 5 mili segundos. Inmediatamente, se resuspendió suavemente la mezcla de electroporación con 1 ml de medio SOC, se depositó en un microtubo estéril y se incubó una hora a 37 °C y 100 rpm. Finalmente, 200 μ l de cada una de las mezclas de electroporación fueron plaqueadas en sus respectivos medios selectivos (dependiendo de los genes de resistencia codificados por los plásmidos) e incubadas a 37 °C *overnight*.

3.2.4 Transformación de levaduras competentes

Para obtener levaduras de la cepa GS115 de *P. pastoris* electrocompetentes, se inocularon 5 ml de medio YPD con 100 μ l de un cultivo stock almacenado a -70 °C de la levadura, y se dejó crecer *overnight* a 30 °C y 100 rpm. Al día siguiente, 500 ml de medio YPD fresco fueron inoculados con los 5 ml del cultivo *overnight* y se dejaron crecer a 30 °C y 100 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,5 y 0, 7. El cultivo fue separado en dos frascos de centrifugación de 250 ml estériles y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C, descartándose los sobrenadantes y

resuspendiendo los pellets de levaduras en 50 ml de YPD. A continuación, se agregaron 1,25 ml de DTT 1 M en cada frasco y se incubó a 30 °C. Al cabo de 15 minutos, se agregaron 200 ml de sorbitol 1 M estéril a 4 °C en cada frasco y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C, descartándose los sobrenadantes. Para disminuir la concentración salina del entorno de las células, se realizaron sucesivos lavados de las levaduras resuspendiéndolas en una solución de sorbitol 1 M estéril a 4 °C, centrifugándolas a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C y descartando el sobrenadante. Secuencialmente, se utilizaron los volúmenes 250 ml y 10 ml de la solución de sorbitol 1 M. Luego de la última centrifugación y descartar el sobrenadante, las levaduras eléctricamente competentes fueron resuspendidas en 0,5 ml de la solución de sorbitol 1 M y utilizadas en el momento para la transformación.

Para realizar la transformación de las levaduras mediante electroporación se trabajó en esterilidad, y las células, ADN a transformar, microtubos de polipropileno de 1,5 ml y cubetas a utilizar se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. En un microtubo se mezclaron 40 µl de levaduras de *P. pastoris* electrocompetentes (1×10^9 células/ml) con 1-2 µl conteniendo 10 µg del ADN a transformar (estéril, purificado y libres de sales). A continuación, la mezcla fue introducida en la cubeta y ésta fue colocada en el equipo *Micropulser Electroporation Apparatus* (Biorad), dónde se le aplicó un pulso de 1,8 kV durante 5 mili segundos. Inmediatamente, se resuspendió suavemente la mezcla de electroporación con 1 ml de la solución de sorbitol

1 M. Finalmente, 200 μ l de la mezcla de electroporación fueron plaqueados en una placa conteniendo medio MD e incubadas a 30 °C durante 72 horas.

3.2.5 Extracción de ADN plasmídico

Para realizar las extracciones de ADN plasmídico, se realizó un cultivo *overnight* a 37 °C y 100 rpm, en 5 ml de medio líquido LB, con el o los antibióticos correspondientes. Dependiendo del tipo de análisis posterior que se deseaba realizar, se han utilizado dos métodos distintos de aislamiento.

Para los ensayos de confirmación de la presencia de un inserto por PCR, en los que no se requiere una pureza muy elevada del ADN plasmídico a utilizar, se realizó una adaptación de la técnica original de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). Los 5 ml del cultivo *overnight* fueron centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet de bacterias en 100 μ l de la solución I (Tabla 8). Luego de añadir 200 μ l de la solución II (Tabla 8) y mezclar suavemente por inversión (4 o 5 veces), la mezcla resultante fue incubada en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 150 μ l de la solución III (Tabla 8), se agitó por inversión y se mantuvo otros 5 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 17000 x g y 4 °C, y aproximadamente 400 μ l del sobrenadante se transfirieron a un tubo limpio en el que se añadió 1 ml etanol absoluto (frío). Luego, se centrifugó durante 20 minutos a 17000 x g y 4 °C, descartándose el sobrenadante y lavando el pellet resultante con 500 μ l de etanol al 70% (frío). El pellet se dejó secando a temperatura ambiente y el

ADN plasmídico obtenido fue resuspendido en 30 µl de agua tridestilada estéril. En algunos casos el ADN obtenido fue tratado con ARNasa A de páncreas bovino (Promega) a una concentración de 100 µg/ml durante 30 minutos a 37 °C.

En aquellos casos en los que se necesitó que el ADN plasmídico fuera de gran pureza (reacciones de digestión enzimática o secuenciación), se utilizó el kit comercial Wizard® Plus SV Mimiprep (Promega), siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante.

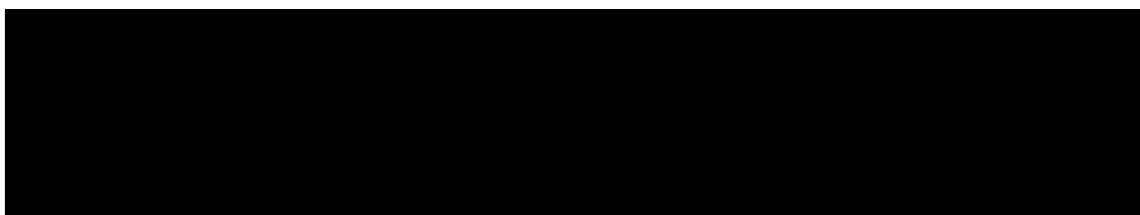


Tabla 8. Soluciones para la extracción de ADN plasmídico (Birnboim y Doly, 1979).

3.2.6 Cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas

Para medir concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas se utilizó el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). La determinación se basa en la unión de sondas específicas que se unen al polímero que se desea cuantificar (proteínas, ADN y ARN). Las sondas son colorantes que presentan una fluorescencia muy baja por sí solas, pero al unirse a sus moléculas objetivo se vuelven intensamente fluorescentes.

Para las determinaciones, se realizó una solución de trabajo que consiste en una dilución 1/200 de las sondas específicas con su respectivo buffer.

Posteriormente, se prepararon los patrones y las muestras como es detallado en la tabla 9.

Luego de mezclar en vórtex durante 5 segundos, se incubaron las muestras durante 2 minutos (15 minutos para las determinaciones de proteínas) a temperatura ambiente y se realizaron las medidas fluorométricas.

Reactivo	Tipo de muestra	
	Patrones	Problema
Solución de trabajo	190 μ l	180-199 μ l
Patrones a agregar	10 μ l	-
Muestra a agregar	-	1-20 μ l
Volumen total	200 μl	200 μl

Tabla 9. Soluciones para medir ácidos nucleicos y proteínas por fluorometría (Invitrogen).

Alternativamente, como método para cuantificar una muestra de proteínas se utilizó una adaptación del protocolo de Bradford (Bradford, 1976). Se prepararon, a partir de una solución patrón 2,5 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), las diluciones 2,5 (directo); 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156 y 0 mg/ml de BSA. Para realizar la curva patrón se mezclaron por duplicado 0,5 ml de cada una de las diluciones con 2,5 ml del reactivo de Bradford. De manera similar, 0,5 ml de las muestras problema se mezclaron con 2,5 ml del reactivo de Bradford. A continuación, se realizó la medida de absorbancia a 595 nm de las soluciones patrones, con las que se armó una curva patrón, y de las muestras problema. La determinación de la concentración de cada

una de las muestras se obtuvo comparando la absorbancia a 595 nm con la de la curva patrón.

3.2.7 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para analizar los fragmentos de ADN, se realizaron electroforesis en geles de agarosa D1-LE (Biodynamics) horizontales y de tamaño 5 x 6,5 cm. La concentración de agarosa en los geles varió entre 0,7 y 1,5% (dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar), y el buffer empleado fue TBE 0,5X: 45 mM Tris (Invitrogen), 45 mM ácido bórico (Invitrogen), 1 mM EDTA (Merck), pH:8.

Las muestras a analizar fueron mezcladas con una sexta parte de buffer de carga (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% de azul de bromofenol y 60% de glicerol) e introducidas en el gel. Como marcadores de longitudes del fragmentos de ADN, se emplearon los siguientes marcadores: λ /HindIII (Promega), λ /EcoRI-HindIII (Promega), 100bp Marker (Promega) o 1Kb Marker (Promega). Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V, en una cubeta horizontal MUPID-2 (Cosmo-Bio) cargada con el Buffer TBE 0,5X durante 40 a 60 minutos. Al finalizar las electroforesis, los ADNs presentes en los geles fueron teñidos por difusión pasiva durante 15 minutos con una solución 0,1 μ g/ml de bromuro de etidio (SIGMA). Para hacer visibles las bandas de ADN teñidas, se empleó un transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tomando el método original de Laemmli (Laemmli, 1970), se realizaron las electroforesis en geles de poliacrilamida. Cada sistema estuvo formado por dos geles de 1 mm de espesor: un gel separador de 5 x 9 cm aproximadamente con una concentración de acrilamida de 8 o 10 % y un gel un gel de apilamiento de 1,5 x 9 cm aproximadamente con una concentración de acrilamida de 5%.

Para realizar los SDS-PAGE, se utilizaron las siguientes soluciones y reactivos:

- Acrilamida-Bisacrilamida: 30 g de acrilamida, 0,8 g de Bis-acrilamida en 100 ml de agua.
- Buffer Tris-Cl 1,5M pH=8,8: 18,5 g de Tris-Base (Invitrogen) en aproximadamente 50 ml de agua, ajustar el pH a 8,8 con HCl y llevar a 100 ml con agua.
- Buffer Tris HCl 0,5M pH 6,8: 6g de Tris-Base (Invitrogen) en aproximadamente 50 ml de agua, ajustar el pH a 6,8 con HCl y llevar a 100 ml con agua.
- SDS 10%: 10 g de SDS (WAKO) en 100 ml de agua.
- APS 10 %: 10mg de persulfato de amonio (Gibco) en 1ml con agua.
- TEMED: solución comercial de N,N,N,N'-Tetrametiletildiamina. (AppliChem)
- 0,1% BB: 10mg de azul de Bromofenol (SIGMA) en 10ml de agua.

- Buffer de reservorio: 0,302 g/l de Tris-Base (Invitrogen), 1,44 g/l de Glicina y 0,1% de SDS.
- Buffer de carga: 1,25ml de Tris-HCl pH6,8 más 2ml de SDS 10% más 2ml de Glicerol y 100 µl de 0,1%BB. Luego agregar agua hasta un volumen final de 10 ml.

Los geles separadores y de apilamiento fueron preparados según se muestra en la tabla a continuación (Tabla 10):

Reactivo / solución	Tipo de gel		
	Separador 10 %	Separador 8%	Apilador 5%
Acrilamila-Bisacrilamida	3,3 ml	2,7 ml	0,83 ml
Buffer Tris-Cl 1,5M pH=8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
Buffer Tris-Cl 1 M pH=6,8	-	-	0,63 ml
Agua	4,0 ml	4,6 ml	3,4 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	50 µl
APS 10 %	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	6 µl	5 µl
Volumen total	10 ml	10 ml	10 ml

Tabla 10. Reactivos y tipos de geles de poliacrilamida empleados (Sambrook, 1989).

Las electroforesis fueron realizadas en cuba Dual Mini Slab (Atto) a voltaje constante entre 50 y 70 V, durante 3,5 a 5 horas, dependiendo del tamaño de las proteínas que se querían separar. Una vez finalizada la corrida electroforética (si los geles no se usaban para un ensayo de western blot), se tiñeron los geles durante 1 hora en agitación suave y a temperatura ambiente con una solución al 0,025% de Coomassie Brilliant Blue R250 (SIGMA). Para decolorar, se utilizó una solución al 30 % de metanol y 10 % de ácido acético

glacial durante un mínimo de 3 horas hasta lograr la decoloración del gel y visualizar las bandas de las proteínas claramente (Sambrook, 1989).

En algunos SDS-PAGE, se utilizó un patrón de BSA (entre 10 y 80 µg/ml) y, mediante el programa TotalLab, se estimó la concentración de las proteínas.

3.2.9 Western blot

Una vez transcurrida la corrida electroforética, se realizó la transferencia de las proteínas desde gel de poliacrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa, mediante el sistema sándwich semi-húmedo *Trans-blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad). Para ello, se recortó un trozo de membrana de nitrocelulosa y cuatro de papel secante, todos con una superficie de 5 x 9 cm. Posteriormente, se formó el sándwich sobre la placa positiva del equipo colocando dos papeles secantes, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y los dos papeles secantes restantes. Todos los componentes del sándwich fueron previamente empapados en el buffer de transferencia y se eliminaron las burbujas de aire entre los componentes del sándwich presionando suavemente.

La transferencia se llevó a cabo durante 30 minutos a 15 V. Posteriormente, se sumergió completamente la membrana de nitrocelulosa en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno a la membrana agitándola suavemente en la solución de lavado. Luego, se incubó la membrana a temperatura ambiente con el anticuerpo primario producido en conejo diluido 100 veces con la

solución de bloqueo, y se dejó durante 90 minutos con agitación suave. Luego de la incubación, se realizaron otros tres lavados adicionales de la membrana con solución de lavado y se la incubó durante 90 minutos con el anticuerpo Anti-IgG de conejo o ratón conjugado con la peroxidasa del rábano picante producido en cabra (Sigma cat. A9044 y cat. A9040, respectivamente) diluido 1000 veces en la solución de bloqueo. Finalmente se realizaron otros tres lavados con solución de lavado y se incubó la membrana con la solución de revelado en agitación suave hasta la aparición de las bandas.

Reactivos y soluciones empleados:

- Buffer de transferencia: Tris-Base 5,82 g; glicina 2,93 g; SDS 10% 3,75 ml; metanol 200 ml; llevar a 1 L con agua.
- Solución de lavado: PBS 999 ml; Tween-20 1 ml.
- Solución de bloqueo: PBS 99,9 ml; Tween-20 0,1 ml; Leche en polvo 5 g.
- Solución de revelado: PBS 100 ml; DAB 30 mg; H₂O₂ 30 µl.

3.3 OBTENCIÓN DEL ADNc viral

3.3.1 Diseño de los *primers*

El diseño de los *primers* para la amplificación del gen de la nucleoproteína N se llevó a cabo a partir de un alineamiento múltiple, realizado con varias secuencias del virus de la rabia. Como base comparativa, se utilizó la secuencia de la cepa CVS-11. En total se utilizaron 27 secuencias (aquellas

que presentaron un porcentaje de identidad superior al 97 % y un porcentaje de cobertura del 100 %), todas ellas obtenidas de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Para el alineamiento, se usó el programa ClustalX (versión 1.81). Una vez realizado el alineamiento, el área de análisis se acotó al marco de lectura abierto (ORF) correspondiente a la N. Teniendo en cuenta el consenso entre las secuencias alineadas y el marco de lectura de la porción codificante, se diseñó el siguiente par de *primers*:

NBacF: 5' GTCTCGAGGATCCATGGATGCCGACAA 3'

NBacR: 5' CGGAAAGCTTATGAGTCACTCGAATATG 3'

Para permitir el posterior clonado del gen, se agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas BamHI y HindIII en los *primers* NBacF y NBacR respectivamente (subrayados en la secuencia).

Para el diseño de los *primers* para la amplificación de la glicoproteína G se procedió de manera similar. Se realizó el alineamiento de 30 secuencias del segmento de la glicoproteína G y, a partir de las regiones conservadas, se buscó un par de *primers* capaz de amplificar el marco de lectura completo del gen:

GLevF: 5' ATGTCGACAAAAGAATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACC3'

GLevR: 5' ATGAATTCTCACAGTCCGGTCTCACCCCGCTCTTG 3'

Para facilitar el posterior clonado del gen, los sitios de reconocimiento para las enzimas Sall y EcoRI fueron introducidos en los *primers* GLevF y GLevR respectivamente (subrayados en la secuencia).

Los sitios de corte que se añadieron en cada par de *primers* (BamHI y HindIII para la N; Sall y EcoRI para la G) fueron seleccionados de modo tal que al realizar la clonación dentro de los vectores de expresión se respeten los marcos de lectura abiertos al momento de la traducción. Además, se buscó que estos sitios de corte no existan dentro las secuencias que codifican para cada gen de interés y que permitan direccionar las inserciones de los fragmentos dentro de los vectores de expresión.

Los dos pares de *primers* fueron analizados mediante el software AnnHyb (versión 4.936), para confirmar la ausencia de posibles estructuras secundarias y la formación de dímeros. Además, se realizó un alineamiento local (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) para comprobar la especificidad de los *primers* y se confrontó su secuencia con la de los otros genes del genoma viral para verificar que no existieran posibilidades de *mispriming* durante la PCR.

3.3.2 Obtención del ARN viral

A partir de una suspensión viral de la cepa vacunal CVS del virus de la rabia, se realizó una extracción del ARN viral con el reactivo TRIZOL® (GibcoBRL), utilizando una ligera adaptación del protocolo brindado por el fabricante. A

500 µl de la suspensión viral, se le añadieron 500 µl del reactivo TRIZOL y 220 µl de cloroformo (Merck). Luego de agitar vigorosamente la mezcla en vórtex durante 10 minutos, se centrifugó a 12000 x g y 4 °C durante 15 minutos. Un volumen aproximado de 650 µl de la fase acuosa superior fue transferido a un nuevo tubo en el que se añadieron 750 µl de isopropanol absoluto (Merck) y se mezcló por inversión. A continuación, se incubó la mezcla a -70 °C durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 x g y 4 °C durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. El pellet de ARN obtenido fue lavado con 1 ml de etanol (Merck) al 75% y centrifugado a 7500 x g y 4 °C durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet de ARN fue secado al aire durante 10 minutos. Finalmente, el ARN fue resuspendido en 50 µl de agua tridestilada libre de nucleasas.

La concentración del ARN obtenido fue determinada por fluorometría. Utilizando espectrofotometría y midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, se realizó una estimación del grado de pureza de la muestra.

3.3.3 Retrotranscripción

El ARN viral extraído fue transformado en una copia del ADN complementario (ADNc). La reacción de retrotranscripción fue llevada a cabo con la enzima retrotranscriptasa del virus de Leucemia Murina de Moloney (MMLV) (Promega).

A 8 µl del ARN viral extraído (aproximadamente 1 µg), se le añadieron 2 µl de una solución de *primers* al azar y 5 µl de agua. La solución fue calentada

durante 5 minutos a 70 °C y luego colocada en hielo 5 minutos. A continuación, se le agregaron 1 µl (200 U) de la enzima MMLV, 5 µl del buffer de reacción 5X provisto con la enzima, 3 µl de una solución 200 µM de cada uno de los dNTPs y 1 µl (40 U) de inhibidor de ARNsas RNAsin® (Promega). Por último, la mezcla fue incubada a 42 °C durante una hora (Tabla 11).

Reactivo	Volumen	Concentración final
Muestra	15 µl	-
Buffer 5X MMLV	5 µl	1X
MMLV	1 µl	200 U
dNTPs	3 µl	200 mM c/u
RNAsin	1 µl	40 U
Total	25 µl	-

Tabla 11. Mezcla de retrotranscripción.

3.4 EXPRESIÓN DE LA NUCLEOPROTEÍNA EN BACTERIAS

3.4.1 Amplificación por PCR

La reacción de PCR para la amplificación del fragmento N se llevó a cabo empleando la combinación de *primers* NBacF-NBacR.

PCR N		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	3 minutos	1
94 °C	45 segundos	30
60 °C	45 segundos	
72 °C	1,5 minutos	
72 °C	10 minutos	1

Tabla 12. Perfil de ciclado para la amplificación del gen N.

Para ello, 5 µl del ADNc obtenido en la retrotranscripción fueron utilizados como molde en un volumen de reacción de PCR de 25 µl. El perfil de ciclado empleado para la reacción de PCR se detalla la tabla 12:

Para confirmar la amplificación del fragmento N, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % con 10 µl del producto la RT-PCR.

3.4.2 Ligación en el vector pQE-30 y transformación en *E. coli*

Una vez comprobado que el tamaño del gen amplificado en la RT-PCR coincidía con el del gen de la nucleoproteína N del virus, se llevó a cabo la ligación del mismo en el vector pQE-30.

En una primera instancia, y para permitir la clonación en la dirección correcta, el amplicón y el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (ambas Promega). Para separar los fragmentos digeridos, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con los volúmenes totales de cada una de las reacciones de digestión. Luego, las bandas correspondientes al inserto y al vector fueron recuperadas del gel mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System extracts DNA fragments* (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de ADN digeridos recuperados fueron cuantificados fluorométricamente para poder proceder a la ligación del vector y el inserto, que se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito para el kit ExpressLink™ T4 DNA Ligase (Invitrogen) (Tabla 13).

Reactivo	Volumen	Cantidad
Vector pQE-30 digerido	X μ l	30 fmol
Fragmento N digerido	Y μ l	90 fmol
Buffer de reacción 5X	4 μ l	-
T4 DNA ligase (5 UI/ μ l)	1 μ l	5 UI
Agua	c.s.p. 20 μ l	-
Total	20 μl	-

Tabla 13. Reacción general de ligación pQE-30-N.

Luego de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar bacterias electrocompetentes (*E. coli* Cepa: M15) por electroporación. La mezcla de transformación fue sembrada en placas de LB Amp Kan y, luego de una incubación *overnight* a 37 °C, se seleccionaron al azar 20 colonias para confirmar el fenotipo y se repicaron en una nueva placa de LB Amp Kan.

3.4.3 Análisis de las colonias de *E. coli*

Para confirmar la presencia del fragmento N en las colonias obtenidas, y poder diferenciarlas de aquellas que adquirieron el plásmido pQE-30 sin el inserto (que también pueden crecer en una placa LB Amp Kan), 14 colonias fueron tomadas al azar y analizadas por *colony*-PCR con los *primers* específicos para el gen de la nucleoproteína N (NBacF-NBacR).

Los productos de la *colony*-PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, para corroborar la banda de ~1,4 Kb correspondiente al gen N.

Una vez seleccionado los clones adecuados para los ensayos de expresión, éstos fueron almacenados a -70 °C en glicerol al 15 % hasta su uso.

Finalmente, para comprobar la identidad y la correcta continuidad del marco de lectura del fragmento clonado, el ADN plasmídico de uno de los clones positivos a la *colony*-PCR fue purificado por medio del kit comercial Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega) y enviado a secuenciar al Servicio de Secuenciación y Genotipado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, utilizando los primers de secuenciación del vector.

3.4.4 Expresión de la nucleoproteína

Las colonias positivas al ensayo de *colony*-PCR fueron seleccionadas para realizar cultivos líquidos, con el fin de comprobar la expresión de la N. Se tomaron 100 µl de los cultivos stocks almacenados a -70 °C y se utilizaron para inocular 5 ml de medio líquido LB Amp Kan, dejándose crecer *overnight* a 37 °C con agitación. A partir de estos cultivos, se realizó una dilución 1/100 (50 µl de cada cultivo *overnight* en 5 ml de medio líquido LB Amp Kan) en tubos plásticos de 15 ml, y se los colocó a 37 °C en un agitador orbital (Minitron incubator shaker, INFORS HT) a 100 rpm el tiempo necesario para que el cultivo alcance una densidad óptica medida a 600 nm entre 0,5-0,7 (aproximadamente 3 hs).

A continuación, se realizó la inducción con IPTG (Fermentas) a una concentración final de 1 mM y se lo dejó crecer durante 2 horas a 37 °C y una agitación de 100 rpm. Simultáneamente, se realizó un cultivo en iguales condiciones de bacterias M15 (conteniendo el plásmido pQE-30 sin inserto) para ser utilizado como control negativo de la expresión.

Una vez transcurridas las 2 horas de inducción, los tubos fueron incubados a 0 °C durante 20 minutos, para detener el crecimiento bacteriano, y centrifugados a 4000 x g durante 15 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido suavemente en 400 µl de buffer de ruptura (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8 M, pH 8). Mediante agitación suave en vórtex durante 30 minutos, se realizó la ruptura de las bacterias y extracción de las proteínas intracelulares. Para eliminar restos celulares, se centrifugó a 15000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 1,5 ml.

Para analizar el nivel de expresión de la nucleoproteína N en los clones seleccionados, 10 µl de cada uno de los extractos crudos obtenidos fueron analizados por SDS-PAGE y western blot, usando como control un lisado de células proveniente de un cultivo de bacterias M15 que contenían el plásmido pQE-30 sin inserto.

3.4.5 Determinación del tiempo de inducción adecuado

Con el propósito de hallar el tiempo de inducción que genere mayor cantidad de N expresada, el clon mas productor fue seleccionado y analizado. Se

realizaron ensayos en medio LB Amp Kan con una concentración del inductor IPTG de 0,5 y 1 mM. Los cultivos se llevaron a cabo en 2 erlenmeyers de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo LB Amp Kan. Se partió de dos cultivos *overnight* (clon a ensayar y clon control con plásmido pQE-30 sin inserto) con el que se realizó una dilución 1/100 (200 μ l del cultivo en 20 ml de medio LB Amp Kan) y se los dejó crecer a 37 °C y 125 rpm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada a 600 nm (DO_{600nm}) (entre 0,5 y 0,7), los cultivos fueron inducidos con IPTG (a 0,5 y 1 mM). Desde la hora 0, se tomaron 2 ml de cultivo cada hora (hasta 3 horas) de cada erlenmeyer para evaluar el mejor tiempo de inducción. Para comparar el nivel de expresión, las alícuotas de los cultivos fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot.

3.4.6 Escalado

Para realizar el escalado del cultivo, se mantuvieron las condiciones ensayadas en erlenmeyer que mayor nivel de expresión arrojaron. Se llevó a cabo un cultivo Batch en el fermentador de 7,5 litros BioFlo 310 Benchtop Bioreactor (New Brunswick-Scientific, Edison, NJ, USA). Para realizar el cultivo semilla, 150 ml de medio LB Amp Kan fueron inoculados con 1 ml del cultivo stock del clon seleccionado, e incubados *overnight* a 37 °C en un agitador orbital. Al día siguiente, este cultivo se utilizó para inocular 3,85 litros del mismo medio en el fermentador (DO_{600nm} inicial \sim 0,100). La temperatura y el pH del fermentador fueron fijados en 37 °C y 7, respectivamente. La

agitación se programó de manera tal de garantizar en todo momento una concentración de oxígeno del 30 % del valor de saturación en el medio de cultivo, y lograr un crecimiento aeróbico del microorganismo. El cultivo se mantuvo en estas condiciones hasta alcanzar una $DO_{600nm} \sim 2$, momento en el cual fue inducido con IPTG en una concentración de 1 mM y se mantuvo durante 3 horas, tomándose muestras de 10 ml de cultivo cada hora. Una vez alcanzadas las 3 horas, el cultivo fue centrifugado a $3000 \times g$ durante 20 minutos a $4^\circ C$ en una centrifuga Thermo Scientific IEC CL40, descartándose el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 160 ml de buffer de ruptura (concentrado 25 veces) y se realizó la ruptura de las bacterias mediante inversión durante una hora. A continuación, se centrifugó a $20000 \times g$ durante 30 minutos a $4^\circ C$ en una centrifuga RS-20IV (TOMY -Seiko) para eliminar los restos celulares. Este sobrenadante fue utilizado para evaluar el nivel de expresión de la nucleoproteína N y realizar la purificación de la misma mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

3.4.7 Purificación de la proteína

Para realizar la purificación de la nucleoproteína N fusionada a los 6 residuos de histidina (N-His), se utilizó el extracto crudo obtenido del cultivo realizado en el fermentador. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) en una columna de 10 ml cargada con una matriz de ácido nitriloacético y níquel (NTA-Ni) (BioRad). Para ello, el pellet resultante del cultivo de 4 litros fue resuspendido suavemente en 160 ml de

buffer de ruptura (25 veces concentrado) y separado en 4 alícuotas de 40 ml que fueron purificadas individualmente.

Una vez equilibrada la resina, haciendo circular 2 volúmenes de columna (20 ml) de buffer de ruptura a pH 8, se sembraron los 40 ml de muestra. A continuación, se realizaron dos lavados con 2 volúmenes de columna (20 ml) de buffer de ruptura (a pH 8 y pH 6,3 respectivamente). Luego, se realizaron las eluciones, con 2 volúmenes de columna cada vez, a pH 5,9 y pH 4,5. Por último, se midió la concentración total de proteínas en cada una de las fracciones por el método fluorométrico. La fracción que contenía la proteína purificada fue dializada contra PBS, esterilizada por filtración (con filtro de 0,22 μ m) y almacenada a - 20 °C hasta su posterior uso.

3.5 EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA EN LEVADURAS

3.5.1 Amplificación por PCR del gen de la glicoproteína

La reacción de PCR para la amplificación del fragmento G se llevó a cabo empleando la combinación de *primers* GLevF-GLevR.

PCR G		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	3 minutos	1
94 °C	45 segundos	30
58 °C	45 segundos	
72 °C	1,5 minutos	
72 °C	10 minutos	1

Tabla 14. Perfil de ciclado para la amplificación del gen G.

Para ello, 5 μ l del ADNc obtenido en la retrotranscripción fueron utilizados como molde en un volumen de reacción de PCR de 25 μ l. El perfil de ciclado empleado para la reacción de PCR se detalla en la tabla 14: Para confirmar la amplificación del fragmento G, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % con 10 μ l del producto la RT-PCR.

3.5.2 Ligación en el vector pCR2.1-TOPO y transformación en *E. coli*

Luego de verificar que el tamaño del gen amplificado en la RT-PCR coincida con el del gen de la glicoproteína G del virus, éste fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO.

El producto de RT-PCR fue purificado utilizando el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System extracts DNA fragments* (Promega) y cuantificado fluorométricamente, al igual que el vector pCR2.1-TOPO.

Con el inserto y vector cuantificados, se procedió a la ligación de los mismos siguiendo el protocolo descripto por el fabricante (Invitrogen) (Tabla 15).

Reactivo	Volumen	Cantidad
pCRTOPO2.1	X μ l	10 ng
Fragmento G	Y μ l	40 ng
NaCl 1,2 M MgCl ₂ 0,06 M	1 μ l	-
Agua	c.s.p. 6 μ l	-
Total	6 μl	-

Tabla 15. Reacción general de ligación pCR2.1-TOPO-G.

La mezcla de ligación se incubó durante 15 minutos a 42 °C y se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes (*E. coli* Cepa: TOP10) por electroporación, que a continuación fueron sembradas en placas de LB Amp con IPTG y X-Gal, e incubadas *overnight* a 37 °C. Posteriormente, se seleccionaron al azar 20 colonias blancas para confirmar el fenotipo y se repicaron en una nueva placa con IPTG y X-Gal.

Para confirmar la ligación y transformación del vector pCR2.1-TOPO-G en las colonias bacterianas blancas de *E. coli*, se seleccionaron al azar 4 colonias y se analizaron por *colony*-PCR con los *primers* específicos para la región M13 (M13F-M13R), presente en el vector. Los productos de la *colony*-PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %. Los clones positivos a la *colony*-PCR fueron seleccionados y almacenados a -70 °C.

3.5.3 Ligación en el vector pPIC9 y transformación en *E. coli*

Tomando una alícuota de un cultivo stock almacenado a - 70 °C de una de las colonias de *E. coli* positivas a la *colony*-PCR para los *primers* M13 (conteniendo al vector pCR2.1-TOPO-G), se realizó un cultivo líquido *overnight* a 37 °C en medio LB Amp. A continuación, se extrajo el ADN plasmídico con un kit comercial y se confirmó la extracción del pCR2.1-TOPO-G de un tamaño aproximado de 5,5 kb mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %.

Se realizó un cultivo *overnight* de una bacteria de *E. coli* conteniendo el vector pPIC9 en medio LB Amp. Se extrajo el ADN plasmídico y, para

comprobar la presencia del vector de 8 kb aproximados, una alícuota de 10 μ l se sembró en una electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %.

Luego de cuantificar fluorométricamente las extracciones de ADN plasmídico del pCR2.1-TOPO-G y del pPIC9, se realizó la digestión de los mismos con las enzimas EcoRI-Sall y EcoRI-XhoI, respectivamente. La enzima XhoI genera un extremo compatible al generado por Sall. Todas las enzimas utilizadas fueron de Promega.

Para separar los fragmentos digeridos, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, con los volúmenes totales de cada una de las reacciones de digestión. Luego, las bandas correspondientes al inserto y al vector fueron recuperadas del gel mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System extracts DNA fragments* (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

A continuación, se cuantificaron los ADN fluorométricamente para poder proceder a la ligación del vector y del inserto, que se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito para el kit ExpressLink™ T4 DNA Ligase (Invitrogen) (Tabla 16).

Reactivo	Volumen	Cantidad
Vector pPIC9 digerido	X μ l	30 fmol
Fragmento G digerido	Y μ l	90 fmol
Buffer de reacción 5X	5 μ l	-
T4 DNA ligase (5 UI/ μ l)	1 μ l	5 UI
Agua	c.s.p. 20 μ l	-
Total	20 μl	-

Tabla 16. Reacción general de ligación pPIC9-G.

Se incubó la mezcla de ligación a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes (*E. coli* Cepa: TOP10) por electroporación. La mezcla de transformación fue sembrada en una placa de LB Amp e incubada *overnight* a 37 °C. Por último, se seleccionaron al azar 20 colonias para confirmar el fenotipo y fueron repicadas a una nueva placa de LB Amp.

La presencia del gen de la glicoproteína G en las colonias bacterianas de *E. coli* obtenidas luego de la transformación con el vector pPIC9-G fue comprobada por *colony*-PCR con los *primers* GLevF-GLevR. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %. Los clones positivos fueron seleccionados y almacenados a -70 °C con una concentración de glicerol de 15 % hasta su uso.

Para comprobar la identidad y la correcta continuidad del marco de lectura del fragmento clonado, el ADN plasmídico fue purificado por medio del kit comercial Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega) y enviado a secuenciar al Servicio de Secuenciación y Genotipado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

3.5.4 Transformación del plásmido pPIC9-G en *Pichia pastoris*

A partir de uno de los clones de *E. coli* conteniendo al vector pPIC9-G, se realizó un cultivo líquido *overnight* a 37 °C en LB Amp y se realizó una

extracción de ADN plasmídico con el kit comercial Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega). Luego de confirmar la extracción del ADN plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %, se cuantificó fluorométricamente.

Para facilitar la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y en el ADN genómico de la levadura *P. pastoris*, el vector pPIC9-G fue linealizado con la enzima SacI. Para ello, 20 µg del vector pPIC9-G fueron digeridos *overnight* a 37 °C con la enzima SacI (Promega), para formar el cassette de expresión lineal. El volumen total de la digestión se sembró en un gel de agarosa al 0,7 % y se realizó una electroforesis. El cassette de expresión fue purificado del gel mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System extracts DNA fragments* (Promega) y cuantificado fluorométricamente. A continuación, 10 µg del cassette de expresión fueron utilizados para transformar 40 µl de células de *P. pastoris* electrocompetentes mediante electroporación.

Luego de la transformación, 400 µl de la mezcla fueron sembrados en una placa de ágar MD (medio mínimo con glucosa y sin histidina). Al cabo de 72 horas a 28 °C, las colonias que crecieron en estas placas fueron repicadas a placas MM (medio mínimo sin histidina, con metanol como única fuente de carbono) e incubadas a 28 °C hasta observar crecimiento (entre 48 y 72 horas). Para confirmar la capacidad selectiva de las placas también se estriaron las cepas originales como control.

3.5.5 Análisis de las colonias de *P. pastoris*

La presencia del gen de la glicoproteína G en las colonias de levadura *P. pastoris* obtenidas en las placas MM, luego de la transformación con el cassette de transformación linealizado pPIC9-G, fue comprobada por *colony*-PCR con los *primers* AOX1F-AOX1R. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %. Los clones positivos fueron almacenados a -70 °C en glicerol al 15 % hasta su uso.

3.5.6 Expresión de la glicoproteína

El vector de transferencia formado pPIC9-G presenta la característica de tener el gen de la glicoproteína G bajo el control del promotor AOX (inducible por metanol). Además, la proteína resultante se encuentra fusionada a un péptido señal que permite la secreción de la proteína al medio de cultivo (factor α).

Se seleccionaron 8 clones positivos en los ensayos de *colony*-PCR para levaduras y se realizaron ensayos de expresión con ellos. Con tal fin, 5 ml de medio YPD fueron inoculados con 500 μ l de los cultivos stock de los clones seleccionados y cultivados *overnight* a 28 °C. Al día siguiente, se utilizaron 1 ml de cada cultivo para inocular 20 ml de medio mínimo con glicerol (BMG) en erlenmeyers de 100 ml, que fueron incubados a 125 rpm y 28 °C durante 20 horas hasta alcanzar una DO_{600nm} aproximada de 4. Posteriormente, se centrifugaron aproximadamente 5 ml de cultivo a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C, y las células fueron recogidas en esterilidad, resuspendiendo

en 20 ml de medio mínimo con metanol BMM y colocadas en erlenmeyers de 250 ml (con una DO_{600nm} inicial aproximada de una unidad). Los erlenmeyers fueron incubados a 125 rpm y 28 °C durante 4 días. Cada 24 horas, se tomaron muestras de 2 ml de cada cultivo para analizar las proteínas secretadas al medio por SDS-PAGE y ELISA. Para mantener al promotor inducido, se añadió metanol diariamente hasta una concentración final de 0,5 %. Simultáneamente, se realizó un cultivo en idénticas condiciones la cepa wild type con el agregado de histidina (para permitir el crecimiento de estas cepas), que fueron utilizados como control negativo.

3.5.7 Escalado

El escalado del cultivo se llevó en a cabo en un fermentador de 7,5 litros BioFlo 310 Benchtop Bioreactor (New Brunswick-Scientific, Edison, NJ, USA).

Se diseñó una estrategia de cultivo de Batch alimentado con dos sustratos diferentes. En primera instancia, se planteó la etapa de crecimiento en glicerol con el fin de aumentar la masa celular. Una vez consumido el glicerol, se diseñó la etapa de alimentación con metanol, mediante una bomba de suministro externa, que adiciona el inductor con el fin de expresar la G.

El medio que se empleó para el cultivo es el MS. Tomando una alícuota de 500 µl del stock del clon seleccionado en los ensayos en pequeña escala, se realizó un cultivo *overnight*, en 5 ml de medio líquido YPD a 28 °C y 100 rpm. Este cultivo fue utilizado para inocular 150 ml de medio sintético MS fresco y

realizar un cultivo semilla, incubando a 28 °C *overnight* con una agitación de 100 rpm. Al día siguiente, el cultivo semilla (con una DO_{600nm} aproximada de 10 unidades) fue utilizado para inocular 3,85 litros de medio SM fresco contenido dentro del fermentador. La temperatura del cultivo y el pH fueron ajustados en 28 °C y 5, respectivamente.

La agitación se programó de manera de mantener el oxígeno disuelto (OD) en torno al 40 % del valor de saturación en el medio de cultivo, durante la fase en la cual el glicerol se mantuvo como única fuente de carbono y energía.

Una vez consumido el glicerol, comenzó la alimentación con metanol. Para ello, se diseñó una estrategia de DO-STAT (derivada del inglés *dissolved oxygen stationary*) para mantener el oxígeno disuelto en torno al 40% del valor de saturación en el medio de cultivo mediante la alimentación con metanol, utilizando un software (BioCommand software, New Brunswick). Durante las 48 horas que duró esta fase, la bomba de alimentación se programó de manera de activarse si el oxígeno disuelto excedía el 42 % del valor de saturación, y detenerse si descendía el 38 % del valor de saturación. Se tomaron muestras del cultivo a las horas 0, 12, 24, 36 y 48 de inducción para ser analizadas mediante SDS-PAGE y western blot. Además, para seguir el crecimiento de las levaduras, se tomaron muestras intermedias y se determinó el peso seco en cada una de las muestras.

Para determinar el peso seco de las muestras, 10 ml de cultivo fueron colocados en tubos de centrifuga de 15 ml (previamente pesados en balanza

analítica) y centrifugados a 10.000 x g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. El pellet de levaduras fue lavado tres veces con 10 ml de agua tridestilada y centrifugada nuevamente a 10.000 x g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Por último, los tubos conteniendo los pellet de levaduras fueron secados overnight a 90 °C y nuevamente pesados. Por diferencia de peso en los tubos, se calculó el peso seco y se expresó en g/l.

Una vez alcanzadas las 48 horas de inducción, el cultivo fue centrifugado a 3000 x g durante 20 minutos a 4 °C, almacenando el sobrenadante. A continuación, el sobrenadante fue ultrafiltrado utilizando un cartucho Pellicon Mini Cassette Holder de 10 kDa de corte (Millipore) y una bomba peristáltica Masterflex I/P™ easy-loaded (Millipore). De esta manera, todo lo que atravesaba al cartucho de 10 kDa era descartado, permitiendo concentrar el sobrenadante de cultivo 20 veces (de 4 litros aproximadamente hasta 200 ml). El sobrenadante concentrado, en un frasco erlenmeyer con salida lateral de 1 litro, se diluyó 5 veces en PBS estéril y se ultrafiltró llevando el volumen a 200 ml nuevamente. Este proceso se realizó 10 veces para eliminar todas las moléculas inferiores a 10 kDa (proteínas, sales, vitaminas, metabolitos del cultivo remanentes, etcétera) y tener las proteínas extracelulares en PBS.

3.5.9 Purificación de la proteína

La purificación de la glicoproteína G se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cromatógrafo líquido (Pharmacia LKB).

La cromatografía, se llevó a cabo utilizando una resina de dietilaminoetil (DEAE) sepharose (Sigma). Esta es una resina de intercambio aniónico débil, que al tener carga positiva adsorbe las que tienen una carga negativa.

Para lograr que la glicoproteína G presente una carga negativa, que le permita pegarse a la resina, se trabajó con a pH=8, ya que el punto isoeléctrico de la misma se encuentra en 6,3 aproximadamente, según estudios bioinformáticos.

Como buffer de pegado, se utilizó Tris-Cl 20 mM, pH=8,0 y como buffer de elución se empleó Tris-Cl 20 mM, NaCl 1M, pH=8,0. Ambos buffers fueron filtrados por un filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm.

Se empacaron 20 ml de la resina DEAE sepharose (Sigma) en la columna. El volumen de columna (VC) es igual a 20 ml. El protocolo utilizado durante la cromatografía es:

- Equilibrar la resina con 5 VC de buffer de pegado (Tris-Cl 20 mM, pH=8,0), conteniendo 0,1 M de NaCl para disminuir el pegado de proteínas con menos carga.
- Inyectar la muestra (5 ml sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* concentrado 20 veces, 5 ml de agua, 10 ml buffer Tris-Cl 40 mM, NaCl 0,2 M, pH=8,0).
- Lavar, para eliminar todas aquellas proteínas que no se unen en tales condiciones, con 4 VC de Tris-Cl 20 mM, NaCl 0,1 M, pH=8,0.
- Se realizó un gradiente de elución con una longitud de 10 VC, comenzando en las condiciones de pegado (Tris-Cl 20 mM, NaCl 0,1

M) y terminando en el 100 % del buffer de elución (Tris-Cl 20 mM, NaCl 1M, pH=8,0).

- Desde el momento de la inyección de la muestra y hasta el final del gradiente se tomaron fracciones de 5 ml para luego analizar.
- Se llevó a cabo la limpieza de la columna con 5 VC de buffer de elución (Tris-Cl 20 mM, NaCl 1M, pH=8,0). A continuación, se pasaron 5 VC de agua filtrada y por último 5 VC de una solución de preservación (etanol al 20 %).

Todas las fracciones de elución fueron analizadas, por SDS-PAGE y western blot, en búsqueda de la G.

Las fracciones que contenían a la glicoproteína G fueron dializadas contra PBS, esterilizadas por filtración (con filtro de 0,22 µm) y almacenadas a - 20 °C hasta su posterior uso.

3.5.10 Ensayo de glicosilación

Para evaluar si la glicoproteína G recombinante fue glicosilada por *P. pastoris*, se realizó un ensayo tratando a la glicoproteína G purificada por cromatografía con la enzima Endoglicosidasa H (New England Biolabs cat. P0702S). Posteriormente, se corrió un western blot. Para este ensayo, se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra la glicoproteína G del virus de la rabia provisto por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Universidad Nacional del Litoral.

3.6 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

3.6.1 Ensayo de desafío

Se llevaron a cabo haciendo una adaptación (para reducir el número de animales empleado) del protocolo descrito por los Institutos Nacionales de Salud (NIH es la sigla en inglés, de *National Institutes of Health*), que pertenecen al Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. El test del NIH es el ensayo internacional para la medición de la potencia de vacunas antirrábicas.

El ensayo se basa en la inmunización de ratones CF-1 de 13-16 gramos, a los 0 y 7 días, con la vacuna a evaluar y se compara con una vacuna de referencia. Los animales son desafiados, a los 14 días de la primo inmunización, con la cepa viral fija CVS, con el objetivo de evaluar si la respuesta inmune desarrollada es protectora y calcular su potencia. Para ello, se realiza la observación de los animales durante los 14 días posteriores a la descarga viral, se anota el día en que mueren (si mueren) los ratones y se describen la presencia de los signos causados por el virus.

Debido a que para realizar este procedimiento es necesaria la manipulación del virus, este ensayo debe hacerse en laboratorios que presenten la contención viral requerida para dicho patógeno. Por tal motivo, el ensayo de potencia del NIH fue llevado a cabo en el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata.

Para el ensayo, se utilizaron seis grupos de ratones. A cuatro de los grupos se los inmunizó, vía intraperitoneal (i.p.), con cuatro formulaciones diferentes de proteínas recombinantes. Además, se utilizaron dos grupos control para que el ensayo sea válido. Las formulaciones empleadas fueron las siguientes:

Formulación A: Conteniendo 5 µg/ml de G recombinante, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

Formulación B: Conteniendo 10 µg/ml de G recombinante, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

Formulación C: Conteniendo 5 µg/ml de G y 5 µg/ml de N, ambas recombinantes, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

Formulación D: Conteniendo 10 µg/ml de G y 10 µg/ml de N, ambas recombinantes, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

- Protocolo:

1. Realizar las diluciones 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 de cada vacuna a evaluar y de la vacuna de referencia en buffer PBS.
2. Preparar grupos de 16 ratones para cada dilución e inyectar 0,5 ml por vía intraperitoneal en los días 0 y 7.
3. En el día 14, desafiar cada ratón inyectando intracerebralmente 0,03 ml de una dilución de CVS conteniendo entre 12 y 50 LD50% (dosis letal 50%)

4. Observar los animales diariamente durante 14 días, anotando el número de ratones muertos.
5. Calcular la dosis efectiva 50% (ED50%, dilución que sea capaz de proteger al 50% de los animales evaluados) de cada muestra. La potencia relativa final de la vacuna evaluada se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$PR = \frac{ED50\% \text{ de } V}{ED50\% \text{ de } VR} \times \frac{\text{dosis de } V}{\text{dosis de } VR}$$

Donde:

PR: potencia relativa

V: vacuna a evaluar

VR: vacuna de referencia

Dosis: volumen de una dosis vacunal

3.6.2 Estimación de la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes

Para evaluar, cualitativamente, si las proteínas recombinantes G y N inducen la producción de anticuerpos específicos contra la glicoproteína G y la nucleoproteína N nativas del virus de la rabia, se inmunizaron ratones por las vías intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.) e intraperitoneal (i.p.) y se analizaron los sueros mediante western blot. Para reducir el número de animales empleados, se utilizó la formulación D que es la que contiene

ambas proteínas recombinantes y en su mayor concentración, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

Se realizó un protocolo de inmunización a los 0 y 14 días por las vías intramuscular, subcutánea e intraperitoneal (Tabla 17). A los 28 días de la primo inoculación, los ratones fueron sangrados a blanco mediante punción cardíaca.

Via de inoculación	Volumen por dosis	Cantidad de proteínas	Dosis
Intramuscular (IM)	100 μl	1 μg de G 1 μg de N	2
Intraperitoneal (IP)	500 μl	5 μg de G 5 μg de N	2
Subcutánea (SC)	200 μl	2 μg de G 2 μg de N	2

Tabla 17. Protocolo de inmunización para análisis cualitativo de anticuerpos.

La sangre obtenida fue incubada a 37 °C durante una hora para permitir la coagulación, y luego a 4 °C durante una noche. A continuación, se centrifugó a 500 x g y 4 °C durante 10 minutos para poder separar el suero del coágulo. Los sueros obtenidos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Como suero control, se utilizó el proveniente de uno de los ratones sobrevivientes al ensayo de potencia del NIH, inoculado con la vacuna de referencia producida por el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata en cerebro de ratón lactante.

Una vez obtenidos los sueros, se realizó un ensayo de western blot, haciendo correr un SDS-PAGE con la vacuna antirrábica producida en cultivo celular (VERORAB). Luego de la transferencia y bloqueo, la membrana fue cortada en tiras finas que luego se utilizaron individualmente con diluciones 1/50 en solución de bloqueo de cada uno de los sueros a ensayar. Luego de una incubación de 90 minutos y 3 lavados en solución de lavado, se incubó durante 90 minutos con una dilución 1/1000 en solución de bloqueo de un suero Anti-IgG de ratón conjugado con la peroxidasa del rábano picante producido en cabra (Sigma cat. A9040). Finalmente se realizaron otros tres lavados con solución de lavado y se incubó la membrana con la solución de revelado en agitación suave hasta la aparición de las bandas.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESIÓN DE LA NUCLEOPROTEÍNA EN BACTERIAS

4.1.1 Amplificación por PCR del gen de la nucleoproteína

Para la obtención del ARN viral se utilizó una cepa vacunal del virus de la rabia CVS, provista por el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata.

Utilizando como material de partida una suspensión viral, se realizó la extracción del ácido nucleico y el ARN obtenido fue resuspendido en 50 µl de agua tridestilada libre de nucleasas. El ARN extraído fue cuantificado fluorométricamente arrojando un valor de 130 ng/µl. Simultáneamente, se realizó una estimación del grado de pureza por la relación de A_{260nm}/A_{280nm}

arrojando un valor de 1,90. Este valor indica que se obtuvo un buen rendimiento en la extracción.

Este molde de ARN fue utilizado para obtener copias de ADNc de los segmentos de la nucleoproteína N y de la glicoproteína G del virus de la rabia, mediante la reacción de retrotranscripción, empleando 1 µg aproximadamente del mismo y primers al azar.

La amplificación por PCR del segmento de la nucleoproteína N se realizó utilizando como molde 5 µl del ADNc sintetizado y los primers específicos NBacF-NBacR. Para confirmar la amplificación del fragmento N, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % con 10 µl del producto la PCR, observándose la presencia de una banda de aproximadamente 1,4 kb (Figura 13), que coincide con el tamaño predicho para el segmento (1373 pb).

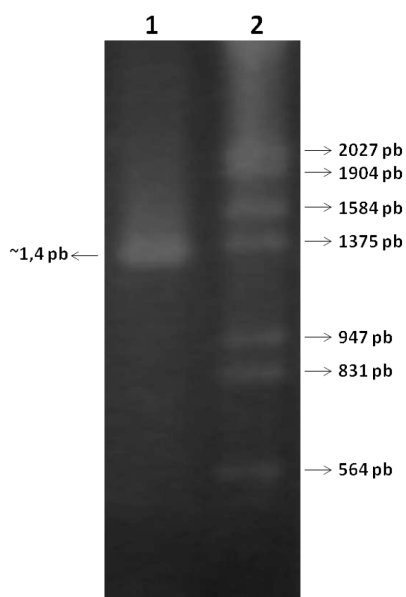


Figura 13. Amplificación por RT-PCR del segmento N. Calle 1: Producto de RT-PCR; calle 2: Marcador de peso molecular Lambda DNA/ HindIII (Thermo Scientific™).

4.1.2 Ligación en el vector pQE-30 y transformación en *E. coli*

Una vez comprobado que el tamaño del gen amplificado en la RT-PCR coincidía con el de la nucleoproteína N rábica, se llevó a cabo la ligación del mismo en el vector pQE-30. Para ello, el amplicón y el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, y las bandas de interés fueron recuperadas. Se cuantificaron fluorométricamente los fragmentos de ADN digeridos en 81,8 fmol/μl para el fragmento N y 2,4 fmol/μl para el vector pQE-30.

Teniendo en cuenta que las condiciones de ligación descritas por el fabricante especifican 90 fmoles de inserto y 30 fmoles de vector, se colocaron 12,5 μl de vector y 1,1 μl de inserto (tabla 18).

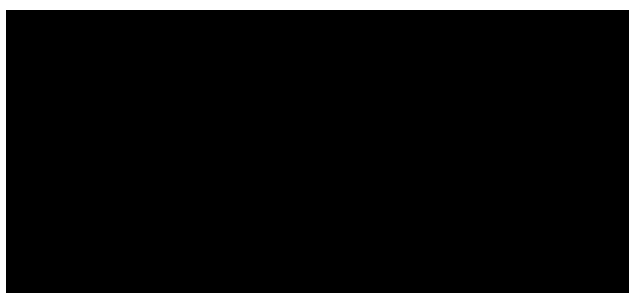


Tabla 18. Reacción de ligación pQE-30-N.

Luego de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar, por electroporación, bacterias de *E. coli* M15 electrocompetentes, que luego fueron sembradas en una placa de LB Amp Kan e incubadas *overnight* a 37 °C. Se obtuvieron alrededor de 100 colonias para la construcción de pQE-30-N.

4.1.3 Análisis de las colonias

Se seleccionaron al azar 20 colonias para corroborar el fenotipo, y se repicaron nuevamente en una placa de LB Amp Kan. Todas las colonias volvieron a crecer normalmente, demostrando de esta manera que todas las colonias seleccionadas tenían un fenotipo resistente a kanamicina y ampicilina y, por consiguiente, habían adquirido el vector de expresión, con o sin el fragmento N, ya que el gen de resistencia a la kanamicina está codificado en el vector pQE-30.

Para confirmar la presencia del gen N, 14 colonias fueron tomadas al azar y analizadas por *colony*-PCR con los *primers* específicos para el gen de la nucleoproteína N (NBacF-NBacR). Los productos de la *colony*-PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, buscando una banda de aproximadamente 1,4 Kb correspondiente al gen N (Figura 14). En 6 de las 14 colonias analizadas (colonias 3, 4, 5, 8, 11 y 14), se observó el resultado positivo y se permitió corroborar la presencia del fragmento N dentro del vector.

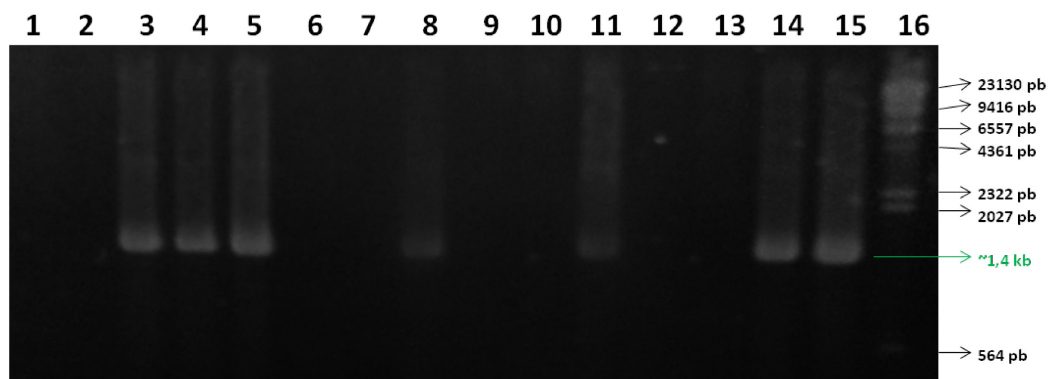


Figura 14. *Colony*-PCR transformación pQE-30-N. Calles 1 a 14: supuestas colonias pQE30-N (colonias 1 a 14); calle 15: control positivo de amplificación; calle 16: Marcador de pesos molecular Lambda DNA/ HindIII.

Finalmente, para comprobar la identidad y la correcta continuidad del marco de lectura del fragmento clonado, se seleccionó una de las colonias positivas a la *colony*-PCR, se realizó una extracción de DNA plasmídico por medio de un kit comercial y se envió a secuenciar (Figura 15), utilizando los *primers* del kit del vector pQE-30 para secuenciar.

```

                                6 x His
1      AATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGATGCCGACA
76     AGATTGTGTTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGT
151    ACCCTGCCATCAAGGATTTGAAAAAGCCTTGATCACCCTAGGGAAGCCCCGACTTGAACAAAGCATACAAAT
226    CAGTTTATCAGGCATGAATGCCGCCAAACTTGATCCGGATGATGTATGCTCCTACTTGGCAGCAGCAATGCAGT
301    TCTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTATGGAATCCTGATTGCACGAAAAGGAGATAGGATCACCC
376    CAAACTCTCTAGTGGAGATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCA TGGAATTGACAA
451    GGGACCCCACTGTCTCTGAACATGCATCTTTAGTCGGTCTTCTCCTGAGTCTGTACAGGTTGAGCAAAATATCAG
526    GACAGAACTGGTAACATAAGACAAACATTGCAGATAGGATAGAGCAGATTTTCGAGACAGCACCTTTTGTTA
601    AGATCGTGGAACACCATAACCCTAATGACAACACAGATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCGAACTTCAGAT
676    TTTTGGCCGGAACCTACGACATGTTTTTCTCACGGATTGAGCATCTGTATTTCGGCAATCAGAGTGGGCACAGTCG
751    TCACCGCTTATGAAGACTGCTCAGGACTGGTATCGTTTACAGGGTTCA TAAAGCAGATCAATC TCACCGCAAGGG
826    AAGCAATACTATATTCTTCCACAAGAACTTTGAGGAAGAGATAAGAA GAATGTTGAGCCAGGGCAAGAGACAG
901    CTGTTCTCACTCTTATTTCACTCACTTCGGTTCAGTGGGAAAGTCTCCTATTTCATCGAATGCTG
976    TCGGTCTATGTGTTCAATCTCATTCACTTTGTTGGATGCTACATGGGTCAAGTCAGATCTCTAAATGCGACGGTTA
1051   TTGCTGCATGTGCCCTCATGAGATGTCTGTTCTAGGGGGCTATTTGGGAGAGGAA TTCTCGGAAAAGGGACAT
1126   TTGAAAGAAGGTTCTTCAGAGACGAGAAAGAACTTCAAGAATATGAGGCGGCTGAACTAACAAAGTCCGACGTGG
1201   CACTGGCAGATGACGGAACCGTCAACTCTGATGACGAGGACTATTTCTCTGGTGAAACCAGAACTCCAGAAGCTG
1276   TCTATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACTGAAGAGATCTCATA TACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCA
1351   ATCATCAAGCCCGTCCAAACTCATTGCGCGAATTTTAAACAAGACATATTCGAGTGACTCATAAGCCTTAATTAG
1426   CTGAGCTTGGAATCCTGTTGATAGAT

```

Figura 15. Secuencia nucleotídica de la nucleoproteína N recombinante. El codón de inicio de la proteína de fusión His-N se muestra subrayado y en negrita. El *tag* de seis residuos de histidina, el primer codón (ATG) de la nucleoproteína N y el codón de parada (TAA) se muestran enmarcados y sombreados. Además, se observan los sitios de corte BamHI y HindIII introducidos en la PCR.

Al analizar la secuencia nucleotídica obtenida (Figura 15), pueden verse los sitios de corte BamHI y HindIII introducidos en la PCR (subrayados en la secuencia). Además, se comprobó que el fragmento clonado se encuentra en marco de lectura con el primer codón ATG del *tag* de histidina. Al analizar la secuencia mediante un alineamiento local, utilizando el programa Blastn, se obtuvo más de un 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la

nucleoproteína N de las cepas virales Pasteur (GU992320.1), SAD-1 (EF206718.1), SAD-BERN (LN713619.1) y ERA (AB781935.1).

Al analizar la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica, puede observarse el *tag* de seis residuos histidina que se encuentra unido al extremo N-terminal de la nucleoproteína N recombinante (Figura 16). Utilizando esta secuencia (sin incluir el *tag* de histidina) como molde para realizar un alineamiento local, usando el programa Blastp, se obtuvo una identidad de secuencia superior al 99 % respecto a varias secuencias de la nucleoproteína N almacenadas en la base de datos, por ejemplo la de la cepa CVS (ALG03758.1).

```

1      MRGSHHHHHHGSMDADKIVFKVNNQVVSLKPEIIVDQY EYKYPAIKDLKK
51     PCITLGKAPDLNKAYKSVLSGMNAAKLDPDDVCSYLAAMQFFEGTCPED
101    WTSYGILIARKGDRIPTNSLVEIKRTDVEGNWALTGGMELTRDPTVSEHA
151    SLVGLLLSLYRLSKISGQNTGNYKTNIADRIEQIFETAPFVKIVEHHTLM
201    TTHKMCANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRVGT VVTAYEDCSG
251    LVSFTGFIKQINLTAREAILYFFHKNFEEEEIRRMFEPGQETAVPHSYFIH
301    FRSLGLSGKSPYSSNAVGHVFNLIH FVGCYMGQVRSLNATVIAACAPHEM
351    SVLGGYLGEFFGKGTFERRFFRDEKELQEYEAELTKSDVALADDGTVN
401    SDDEDYFSGETRSP EAVYTRIMMNGGRLKRSHIRRYVSVSSNHQARPNSF
451    AEFLNKTYSSDS

```

Figura 16. Secuencia aminoacídica de la nucleoproteína N recombinante deducida de la secuencia nucleotídica. Subrayada se encuentra el *tag* de histidina, mientras que el primer residuo de metionina (M) de la nucleoproteína N se encuentra en negrita.

4.1.4 Expresión de la nucleoproteína

El nivel de expresión de la nucleoproteína N fusionada al *tag* de histidina (His-N) en los clones positivos a la *colony*-PCR, fue determinado preliminarmente mediante cultivos líquidos en pequeña escala. Para ello, se inocularon 5 ml de medio LB Amp Kan con 100 µl de los cultivos stock almacenados a -70 °C de los seis clones positivos a la *colony*-PCR (denominados clones 1 a 6) y se incubaron *overnight* a 37 °C. Luego, se realizaron diluciones de los cultivos 1/100 en tubos plásticos nuevos conteniendo 5 ml del mismo medio de cultivo. A continuación, se incubó a 37 °C hasta lograr alcanzar la densidad óptica deseada (DO_{600nm} entre 0,5-0,7) y se indujeron con 1 mM de IPTG durante 3 horas. Como controles negativos de expresión, se utilizaron un cultivo de un clon de *E. coli* M15 conteniendo al vector pQE-30 sin inserto crecido e inducido en las mismas condiciones, y un cultivo de *E. coli* M15 crecido en medio LB Kan e inducido en las mismas condiciones.

Para determinar cuál era el clon más productor de N, las proteínas totales obtenidas, luego del tratamiento con el buffer de ruptura, fueron comparadas por SDS-PAGE y western blot.

En el análisis por SDS-PAGE no se pudo observar alguna diferencia clara en la expresión debido a la gran cantidad de proteínas intracelulares propias del microorganismo. Sin embargo, en el ensayo de western blot pudo verse en la colonia número 6 que la nucleoproteína N fusionada al *tag* de histidina fue reconocida por anticuerpos específicos contra el virus de la rabia, de la misma manera que la nucleoproteína N nativa (Figura 17).



Figura 17. Western blot de las proteínas totales de cultivos bacterianos. Calle 1: Marcador de peso molecular “PageRuler™ Prestained Protein Ladder” (Thermo Fisher); calle 2: Virus de la rabia inactivado; calle 3: Control negativo (Bacterias con pQE-30 sin inserto); calle 4: control negativo (Bacterias sin plásmido); calles 5 a 10: colonias 1 a 6 conteniendo el plásmido pQE-30-N-His.

El clon correspondiente a la colonia 6 fue seleccionado para seguir adelante con el resto del trabajo.

4.1.5 Determinación de la concentración de inductor y el tiempo de inducción adecuados

Para determinar la concentración de IPTG a utilizar en el fermentador, se realizaron dos cultivos del clon seleccionado en erlenmeyers de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo LB Amp Kan. Una vez alcanzada la

densidad óptica deseada (DO_{600nm} entre 0,5-0,7), los cultivos fueron inducidos con IPTG (0,5 y 1 mM). Además, se realizó un cultivo en las mismas condiciones (inducido con 1 mM de IPTG) de un clon de *E. coli* M15, conteniendo al vector pQE-30 sin inserto y se utilizó como control negativo.

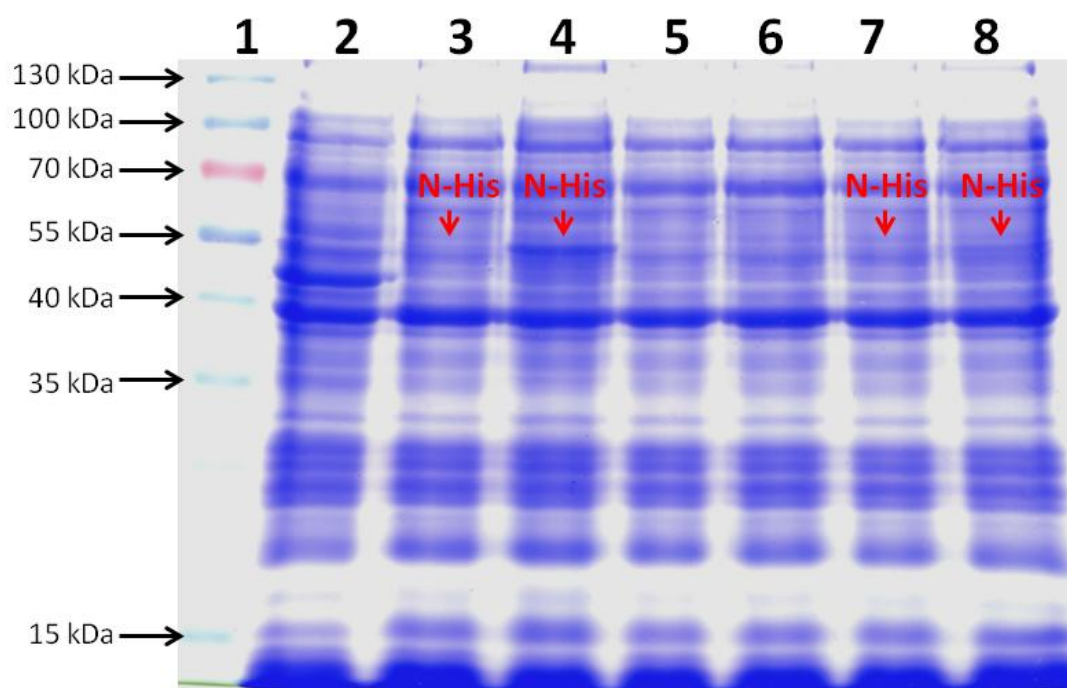


Figura 18. SDS-PAGE para determinar el tiempo de inducción adecuado de los cultivos bacterianos. Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2: control negativo pQE-30, 3 horas de inducción, IPTG 1 mM. Calles 3 a 8 clon recombinante en distintas condiciones; calle 3: 3 horas de inducción, IPTG 0,5 mM; calle 4: 3 horas de inducción, IPTG 1 mM; calle 5: 1 hora de inducción, IPTG 0,5 mM; calle 6: 1 hora de inducción, IPTG 1 mM; calle 7: 2 horas de inducción, IPTG 0,5 mM; calle 8: 3 horas de inducción, IPTG 1 mM.

Las muestras, tomadas a los distintos tiempos, fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot (Figuras 18 y 19, respectivamente). La cantidad de N fusionada al *tag* His (N-His) producida fue mayor cuando la concentración de IPTG utilizada fue de 1 mM. A su vez, no se observa expresión a la hora de inducción en ambos casos; en cambio a las dos y tres horas de inducción se ve expresión para las dos concentraciones de IPTG utilizadas.

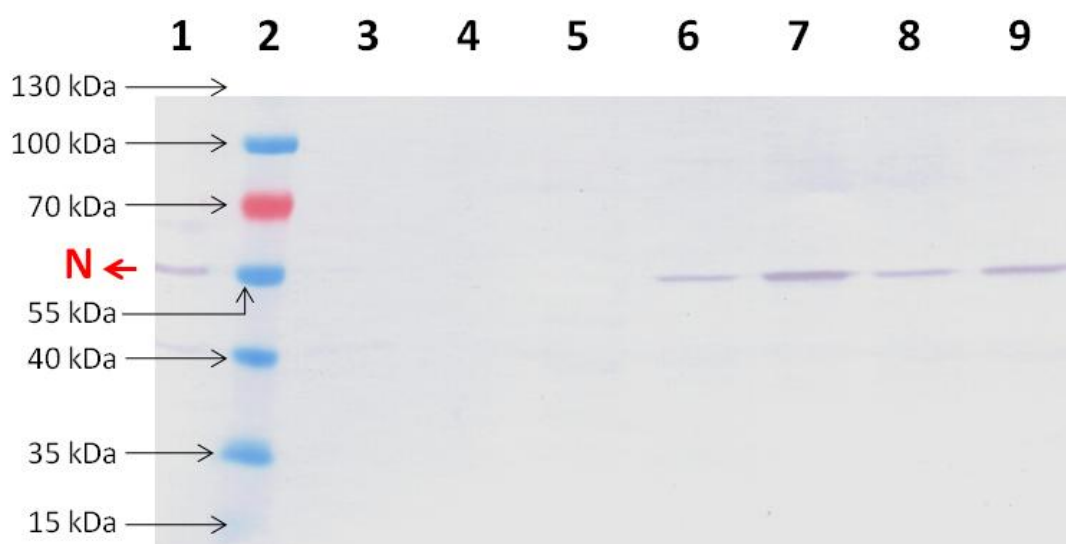


Figura 19. Western blot para determinar el tiempo de inducción de los cultivos bacterianos. Calle 1: virus de la rabia inactivado; calle 2: marcador de peso molecular; calle 3: control negativo pQE-30 a las 3 horas de inducción con IPTG 1 mM. Calles 4 a 9: clon recombinante en distintas condiciones. Calle 4: 1 hora de inducción con IPTG 0,5 mM; calle 5: 1 hora de inducción con IPTG 1 mM; calle 6: 2 horas de inducción con IPTG 0,5 mM; calle 7: 2 horas de inducción con IPTG 1 mM; calle 8: 3 horas de inducción con IPTG 0,5 mM; calle 9: 3 horas de inducción con IPTG 1 mM

Al igual que en el ensayo de SDS-PAGE, en el western blot se ve que la expresión es visible a partir de las dos horas de inducción y es mayor cuando la concentración de IPTG empleada es 1 mM. Comparando la cantidad de N producida a las 2 y 3 horas de inducción con IPTG 1 mM, se nota mayor expresión a las 3 horas. Por lo tanto, se decidió que las condiciones para el escalado sean 3 horas de inducción con una concentración de IPTG de 1 mM.

4.1.6 Escalado

Para realizar el escalado en el fermentador, del clon seleccionado que expresa la N-His en mayor cantidad, se mantuvieron las condiciones en las que más proteína se produjo en erlenmeyer (IPTG 1 mM y 3 horas de inducción). Se realizó un cultivo Batch, utilizando como semilla 150 ml de un cultivo *overnight* en medio LB Amp Kan, y fijando los parámetros en 250 rpm de agitación de para garantizar una buena transferencia de oxígeno, el pH mantenido en 7 (mediante el agregado de ácido o base automáticamente) y el agregado de antiespumante en caso que sea necesario. Si el oxígeno disuelto en el medio disminuía por debajo del 30 %, la agitación incrementaba para asegurar ese nivel de oxígeno mínimo. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada ($DO_{600nm} \sim 2$), fue inducido con IPTG en una concentración de 1 mM durante 3 horas. Finalmente, el cultivo fue centrifugado, guardándose el pellet celular.

El pellet de los 4 litros de cultivo fue resuspendido en 160 ml del buffer de ruptura, agitado vigorosamente, produciendo la ruptura celular y liberación de las proteínas citoplasmáticas. El sobrenadante logrado luego de la centrifugación, fue utilizado para evaluar el nivel de expresión de la nucleoproteína N (Figura 20) y, posteriormente, para realizar la purificación de la misma.

4.1.7 Purificación de la proteína

La purificación de la N-His se realizó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

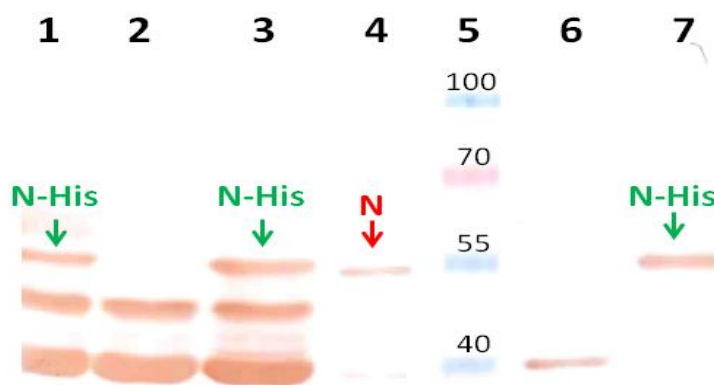


Figura 20. Western blot de las proteínas citoplasmáticas totales del cultivo en fermentador de *E. coli* M15 conteniendo al vector pQE-30-N-His y de las fracciones de la purificación. Calle 1: extracto crudo pQE30-N-His a las 3 horas de inducción con IPTG 1 mM; calle 2: extracto crudo control negativo pQE-30 a las 3 horas de inducción con IPTG 1 mM; calle 3: fracción lavado pH=6,3; Calle 4: virus de la rabia inactivado; Calle 5: Marcador de peso molecular; Calle 6: fracción elución pH=5,9; Calle 7: fracción elución pH=4,5.

Se purificó el extracto crudo en alícuotas de 40 ml (correspondiendo a 1 litro de cultivo). El pegado de la N-His a la matriz se produjo a pH=8, y fue eluída mediante escalones de pH de 20 ml (2 volúmenes de columna) cada uno (pH=6,3 para lavado; pH=5,9 y pH=4,5 para eluciones). Con las fracciones obtenidas, se realizó un ensayo de western blot para determinar la presencia de la N-His (Figura 20). Además, mediante un SDS-PAGE con un patrón de seroalbúmina bovina (BSA) y, utilizando el programa TotalLab, se estimó la concentración de N-His de la fracción purificada en 30 mg/l aproximadamente (Figura 21).

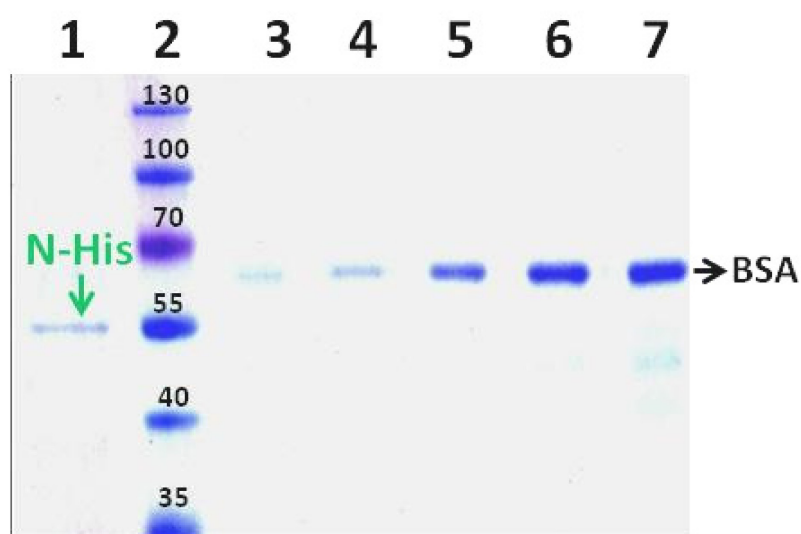


Figura 21. SDS-PAGE de la N-His purificada con un patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

Calle 1: Fracción elución pH=4,5; calle 2: marcador de peso molecular; calle 3: BSA 10 mg/l; calle 4: BSA 20 mg/l; calle 5: BSA 40 mg/l; calle 6: BSA 60 mg/l; calle 7: BSA 80 mg/l.

La concentración proteica total de la fracción que contenía la proteína purificada fue determinada fluorométricamente, arrojando un valor de 40 mg/l. Teniendo la estimación de la concentración de la nucleoproteína N determinada informáticamente, se pudo estimar la pureza de la nucleoproteína N en la fracción como:

$$\text{Pureza} = \frac{30 \text{ mg/l}}{40 \text{ mg/l}} \times 100 = 75 \%$$

A continuación, la fracción purificada fue dializada contra PBS, esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 µm, y almacenada en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

4.2 EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA EN LEVADURAS

4.2.1 Amplificación por PCR del gen de la glicoproteína

La amplificación por PCR del segmento de la G, se realizó utilizando como molde 5 µl del ADNc sintetizado por retrotranscripción y los primers específicos GLevF-GLevR. Para confirmar la amplificación del fragmento G, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % con 10 µl del producto la PCR, y pudo observarse la presencia de una banda de aproximadamente 1,6 kb (Figura 22), que coincide con el tamaño predicho para el segmento (1597 pb).

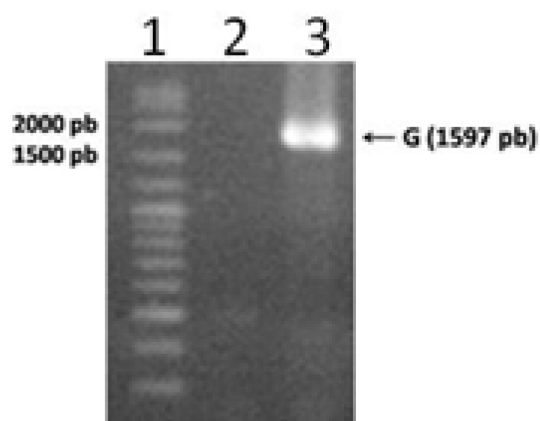


Figura 22. Amplificación por RT-PCR del segmento G. Calle 1: marcador de pesos molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™); calle 2: control negativo de PCR; calle 3: producto de RT-PCR.

4.2.2 Ligación en el vector pCR2.1-TOPO y transformación en *E. coli*

Una vez comprobado que el tamaño del gen amplificado en la RT-PCR coincide con el de la glicoproteína G rábica, se llevó a cabo la ligación del mismo en el vector pCR2.1-TOPO. El producto de RT-PCR fue purificado utilizando un kit comercial. Luego de cuantificar fluorométricamente el fragmento G y el vector pCR2.1-TOPO, ambos se llevaron a una concentración de 10 ng/ μ l y se utilizaron para la ligación (Tabla 19).

Reactivo	Volumen	Cantidad
pCR2.1-TOPO	1 μ l	10 ng
Fragmento G	4 μ l	40 ng
NaCl 1,2 M MgCl ₂ 0,06 M	1 μ l	-
Total	6 μl	-

Tabla 19. Reacción de ligación pCR2.1-TOPO-G.

Luego de incubar la mezcla de ligación durante 15 minutos a 42 °C, se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes (*E. coli* Cepa: TOP10F') por electroporación, que a continuación fueron sembradas en placas de LB Amp con IPTG y X-Gal e incubadas *overnight* a 37 °C. Se obtuvieron alrededor de 50 colonias blancas, de las cuales se seleccionaron al azar 20 para confirmar el fenotipo y fueron repicadas a una nueva placa con LB Amp con IPTG y X-Gal e incubadas *overnight* a 37 °C. De esta manera, todas las colonias seleccionadas presentaron un fenotipo Lac-, lo que implicaba *a priori* que contenían el vector de clonado con el inserto ligado a él.

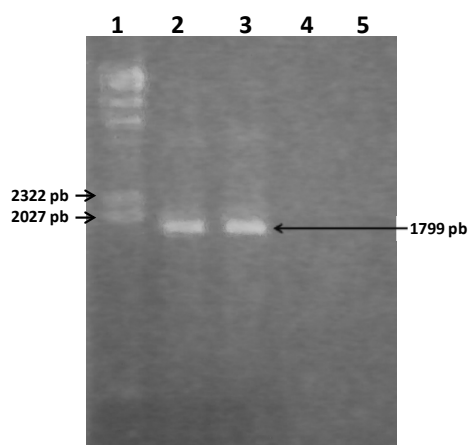


Figura 23. *Colony-PCR* transformación pCR2.1-TOPO-G. Calle 1: marcador de pesos molecular Lambda DNA/ HindIII; calles 2 a 5: supuestas colonias pCR2.1-TOPO-G.

Para determinar la presencia del inserto, 4 colonias blancas tomadas al azar fueron analizadas por *colony-PCR* con *primers* universales de M13, lo que

permitió corroborar la presencia de la banda de 1799 pb correspondiente al inserto dentro del vector en dos de las cuatro las colonias analizadas (Figura 23).

4.2.3 Ligación en el vector pPIC9 y transformación en *E. coli*

A partir de uno de los clones positivos a la *colony*-PCR para los *primers* M13, se realizó el subclonado del gen de la glicoproteína G en el vector pPIC9 (Figura 24).

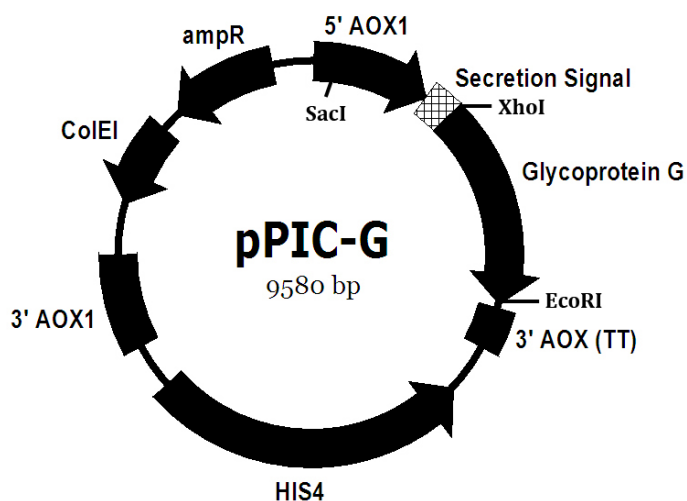


Figura 24. Estructura del plásmido pPIC9-G. 5' AOX1, promotor de la alcohol oxidasa 1; Factor de secreción, señal de secreción del factor α ; 3' AOX (TT), terminador de la transcripción del gen de *P. pastoris* AOX1; *HIS4*, gen para la selección; ColEI, origen de replicación del plásmido colicina E1; ampR, gen de resistencia a ampicilina; XhoI y EcoRI sitios de restricción (Invitrogen).

Para ello, se realizó un cultivo líquido *overnight* de una de las colonias de *E. coli* conteniendo el plásmido pCR2.1-TOPO-G y se extrajo el ADN plasmídico. Paralelamente, se realizó un cultivo *overnight* de bacterias de *E. coli* conteniendo el vector pPIC9 y se extrajo el ADN plasmídico.

Se cuantificaron fluorométricamente el plásmido pCR2.1-TOPO-G y el vector pPIC9. A continuación, se realizó la digestión con las enzimas EcoRI-Sall y EcoRI-XhoI, respectivamente. Luego de una electroforesis para separar los fragmentos digeridos, las bandas correspondientes al inserto y al vector fueron recuperadas del gel. Se llevó a cabo la cuantificación fluorométrica del vector y del inserto (8,8 fmol/ μ l y 11,5 fmol/ μ l, respectivamente), y se ligaron de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (Tabla 20).

Reactivo	Volumen	Cantidad
Vector pPIC9 digerido	2,6 μ l	30 fmol
Fragmento G digerido	10,2 μ l	90 fmol
Buffer de reacción 5X	5 μ l	-
T4 DNA ligase (5 UI/ μ l)	1 μ l	5 UI
Agua	1,2 μ l	-
Total	20 μl	-

Tabla 20. Reacción de ligación pPIC9-G.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes (*E. coli* Cepa: TOP10F') por electroporación, que a continuación fueron sembradas en placas de LB Amp e incubadas *overnight* a 37 °C obteniéndose alrededor de 40 colonias candidatas a presentar al gen de

interés. Por último, se seleccionaron al azar 20 colonias para confirmar el fenotipo y fueron repicadas a una nueva placa de LB Amp.

Utilizando los *primers* específicos para la secuencia AOX1 presentes en el vector, se confirmó la transformación en 4 colonias mediante *colony*-PCR, observándose en los 4 casos una banda de 2 kb aproximados, que coinciden con los 2050 pb esperados (Figura 25).

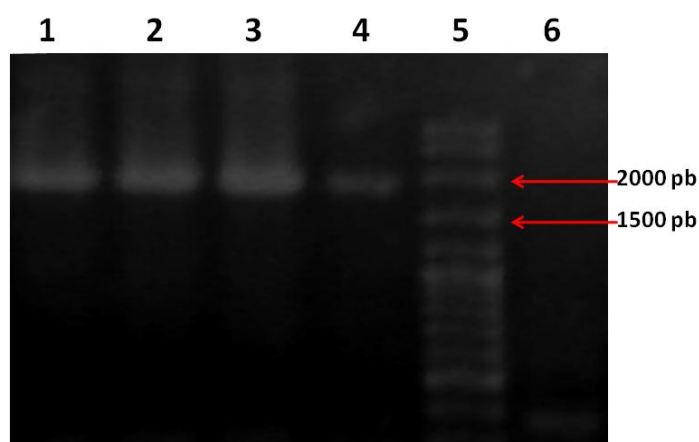


Figura 25. *Colony*-PCR con *primers* AOX1. Calles 1-4: colonias pPIC9-G analizadas; calle 5: marcador de peso molecular 100 bp; calle 6: control negativo de PCR.

4.2.4 Transformación del plásmido pPIC9-G en *Pichia pastoris*

El ADN plasmídico pPIC9-G de uno de los clones previamente analizados fue linealizado con la enzima de restricción *SacI* en la región *AOX1*, generando el cassette de expresión (Figura 26), que se utilizó para transformar, mediante electroporación, células electrocompetentes de *Pichia pastoris* GS115. El producto de la transformación fue sembrado en placas

selectivas de ágar MD (sin histidina), obteniéndose más de 30 colonias a las 72 horas de incubación a 28 °C. Las levaduras transformadas fueron capaces de revertir su auxotrofia a histidina (ya que se insertó el gen *HIS4*) y lograron crecer en placas de ágar MD (Figura 26).

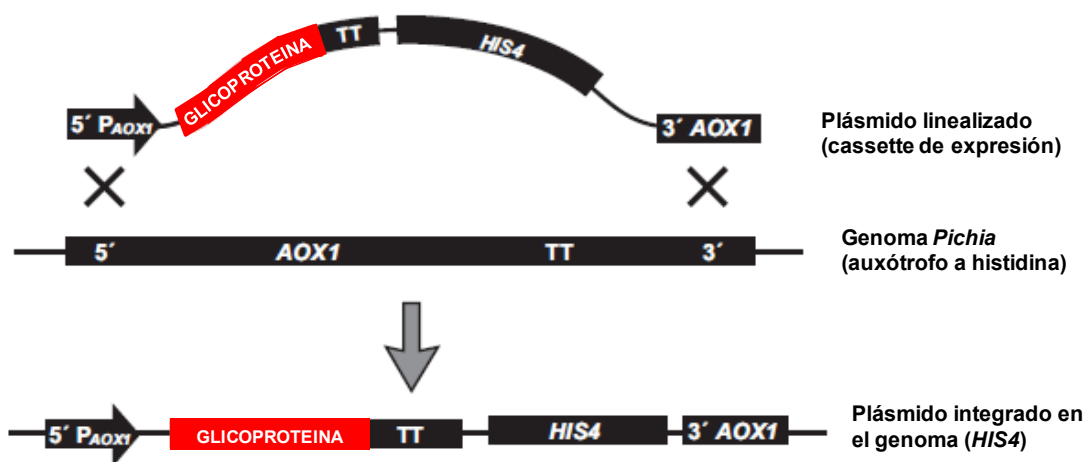


Figura 26. Recombinación del cassette de expresión en *P. pastoris* GS115. El plásmido pPIC9-G linealizado en *SacI* forma el cassette de expresión que puede recombinarse por homología en el genoma de *P. pastoris* GS115, generando un clon recombinante con el gen de la glicoproteína G y el gen *HIS4* que revierte su auxotrofia a histidina (Invitrogen).

4.2.5 Análisis de las colonias

Para confirmar la transformación del plásmido pPIC9-G linealizado en *P. pastoris*, se realizó una *colony*-PCR utilizando los *primers* 5' *AOX1* y 3' *AOX1*. De esta manera, se obtuvo un resultado positivo (dos bandas próximas entre sí de 2,1 kb y 2,2 kb, correspondientes al cassette insertado y al segmento

genómico *AOX1*, respectivamente) en 14 de las colonias analizadas (Figura 27).

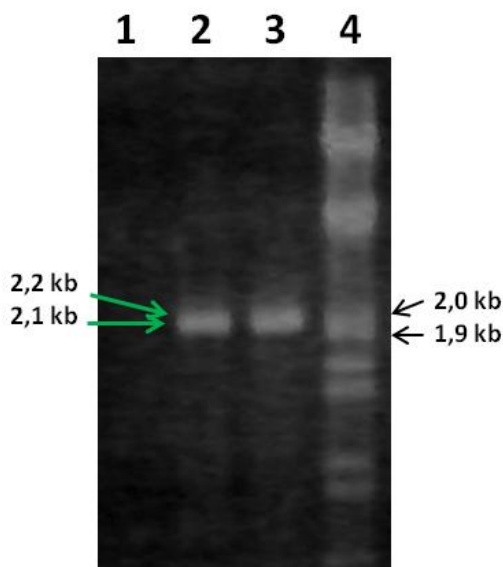


Figura 27. Confirmación de la transformación en *P. pastoris* por *colony*-PCR con *primers* *AOX1*. Calle 1: control negativo; calles 2-3: colonias de levaduras recombinantes analizadas; calle 4: marcador de pesos molecular Lambda DNA/ HindIII.

Para comprobar la continuidad del marco de lectura y la presencia de los sitios de N-glicosilación, necesarios para la correcta glicosilación de la proteína, se tomó al azar uno de los clones conteniendo el plásmido pPIC9-G y se secuenció utilizando los *primers* *AOX1*.

Al analizar la secuencia nucleotídica obtenida (Figura 28), puede verse que el primer codón de la glicoproteína G se encuentra en marco con el primer codón de la secuencia de secreción del factor α . Además se observa la

secuencia de reconocimiento de corte de la proteasa *Kex-2* antes de comenzar el primer codón de la G.

```

1      TTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACATAATTATTCGAAGGATCCAAACGAT
76     GAGATTTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAAC
151    AGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGC
226    TGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCTGCTAA
301    AGAAGAAGGGGTATCTCTCGACAAAAGATGTTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGGTTTTTCGTT
376    GTGTTTCGGGAAGTTCCCATTTACACGATACCAGACGAACCTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGACATACACCATCT
451    CAGCTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGGAACCTCAA
526    AGTGGGATACATCTCAGCCATCAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACAC
601    CAACTTTGTTGGTTATGTCAACAACCATTCAGAGAAAGCATTTCCGCCCCACCCAGACGCATGTAGAGCCGC
676    GTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCCCGACTACCACTGGCT
751    TCGAACTGTAAGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAA
826    ATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAA
901    CCATGATTACACCATTTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGG
976    GAAGAGAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGC GGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAGGAGC
1051   ATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAACATCAGA
1126   TGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGATTGAGCATCTCGT
1201   TGTGGAGGAGTTAGTCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGTAAG
1276   TTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACCTGTCCAGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTT
1351   GATGGAGGCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCCTCAAAGGGTGTTTGAAAGT
1426   TGGAGGAAGGTGCCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTCATGTTGATAATATTAGGGCTGACGACCATGTCCT
1501   AATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGAAATCTTCAGTTATCCCTGATGCA
1576   CCCCCTGGCAGACCCTTCTACAGTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTGTTGAAGTTCACCTCCCGA
1651   TGTGTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCCGAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGC
1726   CATGATTGGCCTGGTGTGATATTTCCCTAATGACATGGTGCAGAAGAGCCAATCGACCAGAATCGAAACAACG
1801   CAGTTTTGGAGGGACAGGGGGGAATGTGTGTCAGTCACTTCCCAAAGCGGAAAAGTCATACCTTCATGGGAATCATA
1876   CAAGAGCGGGGTGAGACCGGACTTGAATTCCTAGGCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGT
1951   TCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGA

```

Figura 28. Secuencia nucleotídica de la glicoproteína G recombinante. La secuencia de secreción del factor α se muestra sombreada de gris y la secuencia de reconocimiento de corte de la proteasa Kex-2 se muestra río abajo y subrayada. En negrita y enmarcados se muestran el primer codón (ATG) de la glicoproteína G y el codón de parada (TGA). Al lado del codón de parada se muestra subrayado el sitio de corte EcoRI.

Al analizar la secuencia de la glicoproteína G mediante un alineamiento local, utilizando el programa Blastn, se obtuvo más de un 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la glicoproteína G de las cepas virales Pitman Moore (AJ871962) y CVS-11 (GQ918139.1).

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante (Figura 29), deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida, presentó más de un 99 % de identidad al ser comparada con la secuencia de la glicoproteína G de la cepa CVS (BAN66661.1). Además, pueden observarse los tres sitios de N-glicosilación descritos por Wiktor (Wiktor y col., 1973) esenciales para la glicosilación de la proteína.

```

1 MVPQALLFVP LLVFPLCFGK FPIYTIPDKL GPWSPIDIHH LSCPNNLVVE
51 DEGRTNLSGF SYMELKVGYI SAIKMNGFTC TGVVTEAETY TNFVGYVTTT
101 FKRKHFRPTP DACRAAYNWK MAGDPRIEES LHNPPDYHW LRTVKTTKES
151 LVIISPSVAD LDPYDRSLHS RVFPGGKCSG VAVSSTYCST NHDYTIWMPE
201 NPRLGMSCDI FTNSRGKRAS KGSETCGFVD ERGLYKSLKG ACKLQLCGVL
251 GLRLMDGTWV SMQTSNETKW CPPGQLVNLH DFRSDEIEHL VVEELVKKRE
301 ECLDALESIM TTKSVSFERR SHLRKLVPGE GKAYTIFNKT LMEADAHYKL
351 VRTWNEIIPS KGCLRGGRC HPHVNGVFFN GIILGPDGNV LIPEMQSSLL
401 QQHMELLVSS VIPLMHPLAD PSTVFKNGDE AEDEFVEVHLP DVHERISGVD
451 LGLPNWGKYV LLSAGALTAL MLIIFLMTCW RRVNRSEPTQ HNLRGTGREV
501 SVTPQSGKII SSWESYKSGG ETGL

```

Figura 29. Secuencia aminoacídica de la glicoproteína G recombinante deducida de la secuencia nucleotídica. Subrayados se encuentran los sitios de N-glicosilación (Wiktor y col., 1973).

4.2.6 Expresión de la glicoproteína en pequeña escala

Se realizaron los ensayos de expresión en escala de frasco erlenmeyer para determinar la capacidad productora de G en 8 clones de levadura positivos a la *colony*-PCR. Los sobrenadantes de cultivos, a los distintos tiempos de inducción, fueron evaluados mediante SDS-PAGE para determinar la presencia de la G, contrastándolos con el sobrenadante de un cultivo de la cepa control *Pichia pastoris* GS115 sin transformar, crecido en las mismas condiciones pero con el agregado de histidina (Figura 30).

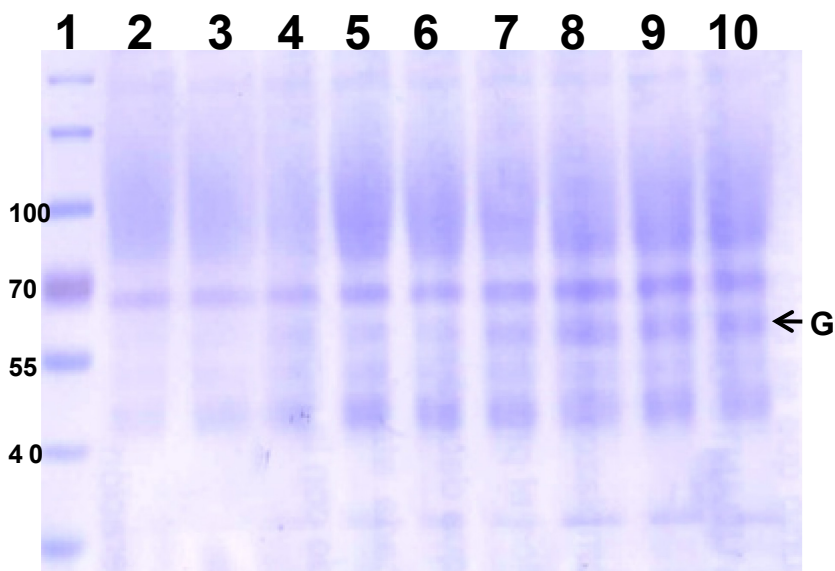


Figura 30. SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos *P. pastoris* en pequeña escala en medio BMG/BMM a las 48 horas de inducción. Calle 1: marcador de pesos moleculares;

calle 2: *P. pastoris* GS115 sin transformar; calles 3 a 10: clones de *P. pastoris* GS115 recombinantes (1 a 8 en orden).

En todos los clones analizados, se observó la expresión de la G, aunque en diferentes niveles. El clon número 6 (calle 8 de la Figura 30) fue el que mayor nivel de expresión arrojó y fue el que se eligió para realizar ensayos de escalado en fermentador, para intentar mejorar la producción de la glicoproteína G recombinante.

4.2.7 Escalado

El cultivo en el fermentador del clon de *P. pastoris* seleccionado se realizó con el método DO-stat descripto.

Se fue midiendo la DO_{600nm} y determinando el peso seco del cultivo a lo largo del Batch y del Batch alimentado. Se determinó la relación entre densidad óptica y peso seco, encontrándose que 1 unidad de densidad óptica equivale a 0,24 g/l de peso seco de *P. pastoris*. De esta manera, se obtuvieron rendimientos de crecimiento de 0,634 g de células / g de glicerol y 0,073 g de células / g de metanol.

Mediante la estrategia de alimentación diseñada, fue posible mantener el nivel de oxígeno disuelto alrededor del 40 % de saturación como se deseaba (Figura 31). Cuando se alcanzaron las 48 horas de alimentación, el peso seco de las células fue 44,92 g/l. Por su parte, las velocidades de crecimiento

específicas iniciales fueron de $0,258 \text{ h}^{-1}$ y $0,027 \text{ h}^{-1}$ en glicerol y metanol, respectivamente.

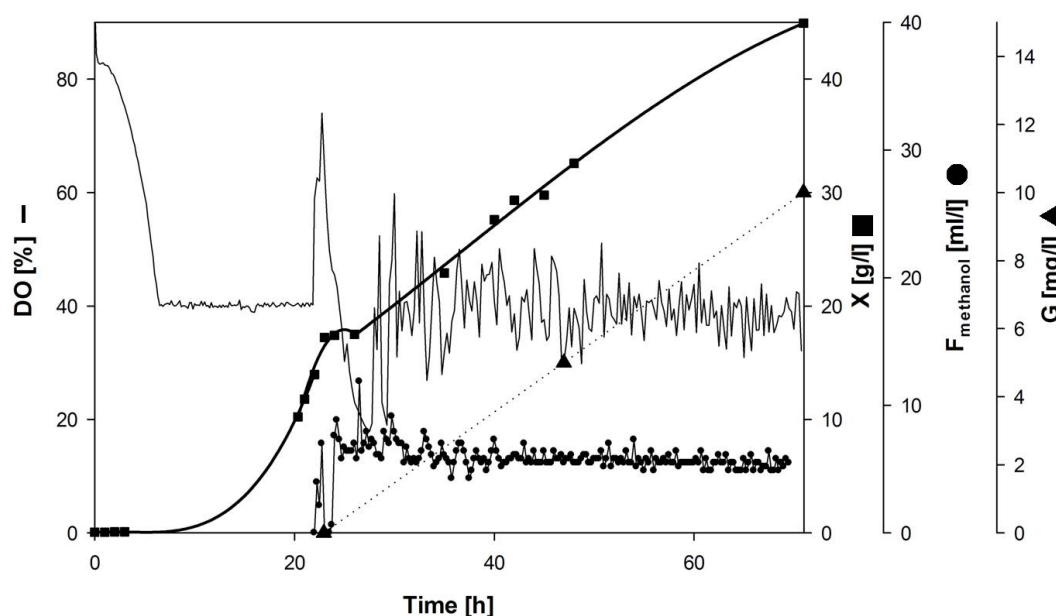


Figura 31. Datos de la fermentación de alta densidad del cultivo de *P. pastoris* recombinante. Perfiles en función del tiempo de cultivo. Peso seco (■), porcentaje de oxígeno disuelto (-), flujo de metanol (●) y proteína G expresada (▲) en el cultivo batch alimentado con el método DO-stat. La alimentación con metanol comenzó a las 22 horas de cultivo y se control el oxígeno disuelto en torno al 40%.

Al analizar el sobrenadante mediante SDS-PAGE, pudo observarse una banda intensa a las 48 horas de inducción a la altura de 60–65 kDa en el sobrenadante de cultivo del clon recombinante no presente en el control negativo (Figura 32A). Utilizando el programa TotalLab, la concentración de la glicoproteína G expresada y el tamaño molecular se estimaron en 10 mg/l

y 65 kDa respectivamente. Al realizar el ensayo de western blot, la banda en cuestión fue reconocida por anticuerpos anti-rabia (Figura 32B). Las diferencias de movilidad causadas por los glicanos se analizaron mediante tratamiento con Endo H y posterior análisis por western blot (Figura 32C).

La glicoproteína G recombinante presenta 3 sitios de N-glicosilación (deducido de su secuencia aminoacídica), y se demostró la glicosilación debido a una mayor movilidad en SDS-PAGE fue evidente después del tratamiento con Endo H.

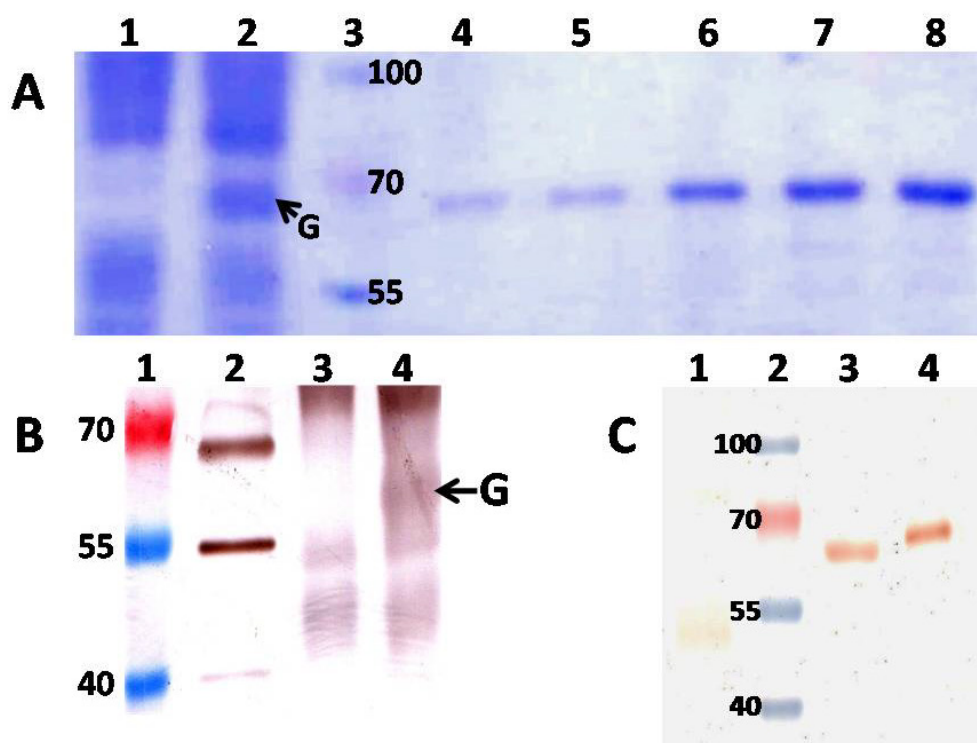


Figura 32. Análisis por SDS-PAGE y western blot del sobrenadante de cultivo en fermentador. A. SDS-PAGE. Sobrenadantes de cultivo cuatro veces concentrados (10 μ l) a las 48 hs de inducción con metanol: calle 1, *P. pastoris* no-transformada (control negativo); calle 2, clon *P. pastoris* recombinante; calle 3, marcador de pesos moleculares; calles 4-8,

100, 200, 400, 600, 800 ng de BSA. B. Western blot usando un anticuerpo policlonal. Calle 1: marcador de pesos moleculares; Calle 2: 10 µl de vacuna antirrábica (VERORAB - SANOFI PASTEUR); la banda superior es la glicoproteína G y la inferior la N; calle 3: *P. pastoris* no transformada (control negativo); calle 4, clon *P. pastoris* recombinante. C. Western blot con tratamiento con EndoH, utilizando un anticuerpo monoclonal. Calle 1, *P. pastoris* no transformada (control negativo); calle 2 marcador de pesos moleculares; Calle 3, proteína G tratada con EndoH; calle 4, proteína G sin tratar.

4.2.8 Purificación de la proteína

La purificación de la glicoproteína G se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una resina de dietilaminoetil sepharose (DEAE). Las fracciones eluídas fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Figura 33).

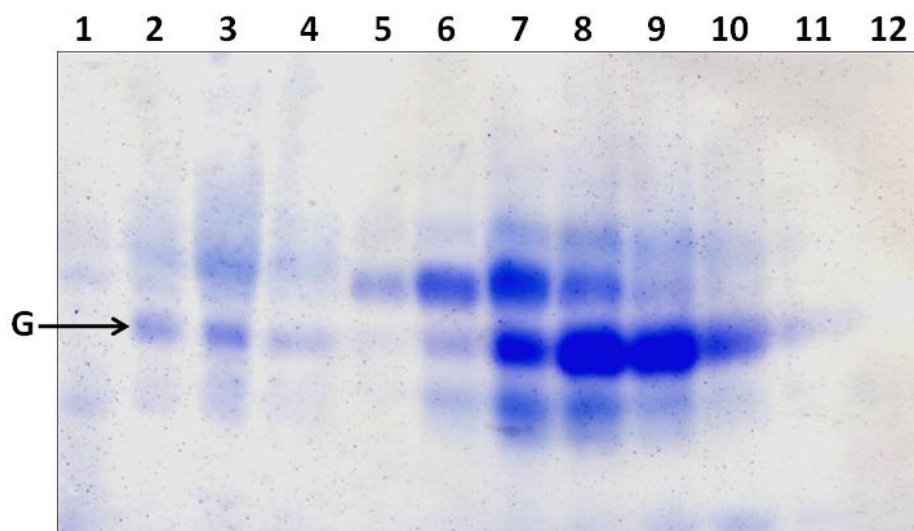


Figura 33. SDS-PAGE Fracciones de elución de la cromatografía del cultivo de *P. pastoris*-G en fermentador. Calle 1: control negativo de *P. pastoris*; calle 2: muestra a purificar (sobrenadante de cultivo *P. pastoris*-G en fermentador); calle 3: fracción no retenida; calle 4:

fracción 1; calle 5: fracción 10; calle 6: fracción 11; calle 7: fracción 12; calle 8: fracción 13; calle 9: fracción 14; calle 10: fracción 15; calle 11: fracción 16; calle 12: fracción 17.

La fracción 14 de la elución fue la que presentó una concentración elevada de la G, con una baja proporción de las otras proteínas contaminantes del cultivo de *P. pastoris*. Esta fracción fue dializada contra PBS y esterilizada por filtración, a través de un filtro de 0,22 μm , y posteriormente almacenada en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

4.3 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

4.3.1 Ensayo de desafío

El test del NIH es el ensayo internacional para la medición de la potencia de vacunas antirrábicas. Se llevaron a cabo las inoculaciones por la vía intraperitoneal de las cuatro formulaciones a probar (utilizando como adyuvante hidróxido de aluminio), el grupo control inoculado con vacuna de referencia (control de protección) y el grupo control sin inocular (control de virus). A los 14 días de la primo inoculación, los ratones fueron descargados intracerebralmente con la cepa viral fija CVS, y observados durante 14 días.

Todos los ratones que fueron inoculados con las distintas formulaciones conteniendo las proteínas recombinantes producidas, murieron entre los días 5 y 6 luego de la descarga viral, de igual manera que el grupo control que no había sido inmunizado. Este es el período esperado para ratones que no tienen un título de anticuerpos suficientes para contrarrestar o retardar el

efecto letal de la infección viral. Para confirmar la validez del test, los ratones que fueron inoculados con la vacuna de referencia mostraron reaccionar satisfactoriamente al desafío viral.

4.3.2 Estimación de la capacidad de inducir anticuerpos

Para evaluar si el resultado negativo arrojado en el test de potencia fue debido a que las proteínas recombinantes eran incapaces de inducir la producción de anticuerpos específicos contra la glicoproteína G y la nucleoproteína N nativas del virus de la rabia, se realizó un ensayo de inmunización de ratones por diferentes vías (i.p., s.c., i.m.) y se analizaron cualitativamente los sueros mediante western blot (Figura 34).

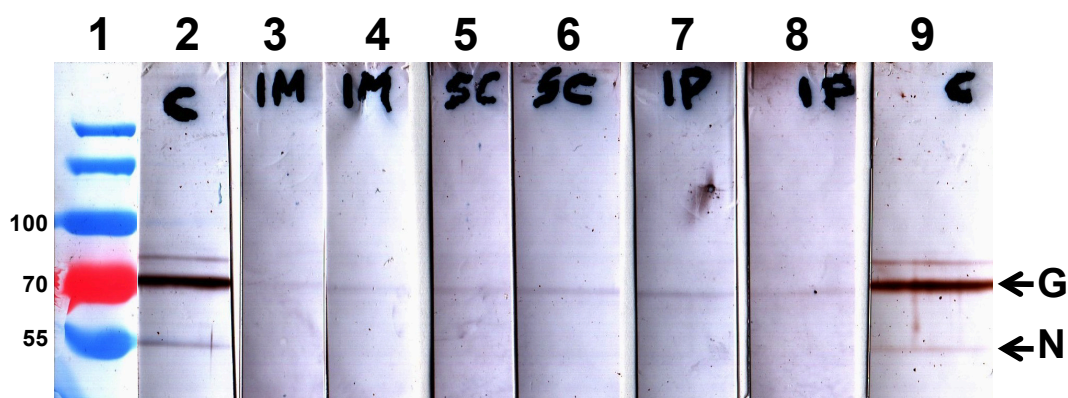


Figura 34. Western blot de los sueros de ratones inoculados con las proteínas recombinantes. Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2: suero ratón sobreviviente al test de potencia inmunizado i.p.; calle 3: suero ratón 1 inmunizado i.m.; calle 4: suero ratón 2 inmunizado i.m.; calle 5: suero ratón 1 inmunizado s.c.; calle 6: suero ratón 2 inmunizado

s.c.; calle 7: suero ratón 1 inmunizado i.p.; calle 8: suero ratón 2 inmunizado i.p.; calle 9: suero ratón sobreviviente al test de potencia inmunizado i.p.

En el ensayo cualitativo, pudo verse la presencia de anticuerpos específicos contra la glicoproteína G rábica nativa en el suero de los animales inoculados por las tres vías (intramuscular, subcutánea e intraperitoneal). Sin embargo, el nivel de anticuerpos fue notoriamente inferior al alcanzado por el animal que había sobrevivido al desafío contra el virus rábico.

En cuanto a los anticuerpos específicos contra la nucleoproteína N rábica nativa, en los sueros provenientes de las inoculaciones subcutánea, intraperitoneal e intramuscular pudo observarse una banda muy tenue (en orden decreciente el nivel de intensidad). Las intensidades de estas pequeñas bandas, observables con dificultad y solamente a ojo desnudo, fueron claramente menores respecto de la banda que se observó cuando se utilizó el suero proveniente del ratón sobreviviente al desafío contra el virus rábico.

5. DISCUSIÓN

La rabia es una de las enfermedades más viejas que afecta a la humanidad de la que se tiene registro, existiendo reportes de más de 2000 años. El agente causal de la enfermedad es un virus del género *Lyssavirus* que se encuentra mundialmente distribuido, siendo mantenido en diversas especies de mamíferos dentro de los órdenes *Carnivora* y *Chiroptera*, mientras que los

seres humanos no contribuyen al mantenimiento del virus y se consideran huéspedes finales o sin salida.

El número anual de muertes humanas en todo el mundo por rabia se estima en 59.000 (Hampson y col., 2015). La mayoría de ellas ocurre en países subdesarrollados o en desarrollo, donde la rabia canina es endémica. La vía de transmisión más frecuente hacia el ser humano es mediante saliva de animales infectados (mayormente perros y gatos).

El virus de la rabia presenta tropismo por células nerviosas y al ser inoculado por vía subcutánea o intramuscular, como sucede naturalmente por una mordedura o lamedura, se propaga desde el lugar de inoculación hacia el sistema nervioso central. Una vez que llega al sistema nervioso central, causa una forma letal, cercana al 100%, de encefalomiелitis en seres humanos y animales susceptibles al virus.

En Argentina, se presentan brotes esporádicos, cada vez más frecuentes, de rabia en animales de compañía fundamentalmente en el norte. Esto es debido a la elevada permeabilidad sanitaria que presenta la frontera entre Argentina y Bolivia, país en donde la rabia es endémica y ocasiona numerosas muertes de animales y personas. Además, en Argentina la rabia aérea es endémica y, según las estadísticas de Zoonosis Urbanas del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, la prevalencia anual de quirópteros insectívoros positivos a rabia, en esta provincia, es del 4,4 al 4,9%. Esto aumenta el riesgo de transmisión hacia animales de compañía, y

consecuentemente hacia el humano, debido a que suelen interactuar con los murciélagos.

En Argentina, además, existen murciélagos hematófagos que funcionan como transmisores de virus rábico hacia otros animales ocasionando rabia pasesiente en bovinos, equinos y ovinos, y esporádicamente en el hombre. La rabia pasesiente se encuentra difundida desde México hacia la zona central de Argentina principalmente en zonas tropicales o subtropicales, ocasionando una gran pérdida económica a los productores y requiere de millones de dosis anuales de vacunas (Shwiff y col., 2013).

Hasta la actualidad, no se ha descrito una terapia efectiva para contrarrestar la infección una vez que los síntomas clínicos aparecen. Para poder controlar la presencia del virus en las zonas afectadas y disminuir la probabilidad de contagio al ser humano, resulta de vital importancia tomar una serie de medidas. Entre ellas, se priorizan la implementación de un plan de vacunación masivo de los animales que pueden actuar como vehículos para el virus, la reducción de animales callejeros y realizar campañas de concientización de la sociedad acerca de los riesgos y cuidados que hay que tener para tal enfermedad, que incluyen la vacunación antirrábica obligatoria anual en perros y gatos.

En Argentina, en las campañas de vacunación se utilizan vacunas producidas en ratones lactantes. Estas vacunas han sido desaconsejadas por la OMS hace muchos años (OMS, 2007) y, por ello, es necesario el

desarrollo nacional de alternativas para producción de vacunas, ya que la importación de numerosas dosis implica un costo elevado.

En este contexto se desarrolló este trabajo de tesis con el fin de evaluar la producción de proteínas recombinantes como una alternativa para la profilaxis antirrábica. Este sistema de producción presenta una serie de ventajas respecto al método actual de producción de vacunas antirrábicas en Argentina, entre las que se destacan el bajo costo de producción, el bajo nivel de bioseguridad necesario (no se tiene que manipular al virus) y que no se emplean ratones para multiplicar el virus.

Con tal fin, se produjeron en forma recombinante las dos proteínas virales de mayor nivel inmunogénico, la glicoproteína y la nucleoproteína.

La nucleoproteína del virus de la rabia, como ya se ha mencionado anteriormente, presenta una fosforilación el residuo serina de la posición 389 llevada a cabo por una casein quinasa celular II (Gupta y col., 2000); esta fosforilación estabiliza la interacción entre la nucleoproteína y la fosfoproteína en el complejo RNP (Toriumi y Kawai, 2004). Además, algunos estudios sugieren que la fosforilación de N cumple un rol importante en la regulación de la transcripción y replicación del ARN viral (Liu y col., 2004; Yang y col., 1999).

Durante el desarrollo de la expresión heteróloga de proteínas en bacterias, se estableció como ley que los organismos procariotas son incapaces de realizar modificaciones post traduccionales, dejando este tipo de modificaciones exclusivamente a los organismos eucariotas. La fosforilación

de proteínas en los aminoácidos serina, treonina y tirosina, es considerada la principal modificación post traduccional reguladora en células eucariotas. Con la aparición de la proteómica, se hizo evidente la abundancia y complejidad de las modificaciones post-traduccionales (Choudhary y Mann, 2010). Varias de las modificaciones que anteriormente se consideraban restringidas a especies eucariotas, como la fosforilación de serina/treonina (Dworkin, 2015) y la fosforilación de tirosina (Hansen y col., 2013), entre otras, ahora se sabe que también son relativamente comunes en especies procariotas. De hecho, estudios sugieren a la fosforilación serina, treonina y tirosina como una modificación post traduccional presente desde el inicio de la vida celular (Macek y col., 2007).

Si bien *E. coli*, al ser un organismo procariota, se describe que no es el ideal para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores, debido a la incapacidad durante el desarrollo de esta tesis de expresar la nucleoproteína en *P. pastoris*, se escogió a *E. coli* como organismo productor de la nucleoproteína recombinante. Si bien no se ha descrito que la fosforilación de la nucleoproteína tenga alguna importancia inmunológica, a la hora de elegir *E. coli* nos basamos en la capacidad, descrita mediante proteómica, que presenta este microorganismo de fosforilar.

E. coli presenta una serie de ventajas a la hora de producir proteínas recombinantes. Es uno de los microorganismos más estudiados, su genética es bien conocida, es sencillo de manipular, tiene una tasa de crecimiento

elevada en medios mínimos, con escasos requerimientos nutricionales y en la actualidad existe una gran disponibilidad de cepas y vectores. Estas características hace que sea una de las primeras posibilidades que se tenga en cuenta cuando se desea expresar proteínas recombinantes (Lee, 1996). Sin embargo, presenta las desventajas de no poseer un sistema eficiente para realizar modificaciones post traduccionales, una baja tasa de secreción de la proteína al medio de cultivo, puede formar cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular y generan endotoxinas.

El gen que codifica para la nucleoproteína de la rabia fue clonado en *E. coli* mediante técnicas de biología molecular. Con tal fin se escogió el vector de expresión del pQE-30, que presenta la posibilidad de obtener la proteína fusionada a una secuencia de 6 histidinas consecutivas para facilitar la recuperación del producto por medio de una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Además, presenta el promotor fuerte del bacteriófago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*), que permite la expresión en alto nivel de la proteína de interés.

Mediante un alineamiento local, se comparó la secuencia clonada con una base de datos y se observó más de un 99% de identidad con las secuencias de la nucleoproteína de las cepas virales fijas Pasteur (GU992320.1), SAD-1 (EF206718.1), SAD-BERN (LN713619.1) y ERA (AB781935.1) (Figura 17). Al analizarse la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica, pudo observarse el *tag* de seis residuos histidina que se encuentra unido, y en marco, al extremo N-terminal de la nucleoproteína recombinante (Figura

18). Además, se obtuvo una identidad de secuencia superior al 99 % respecto a varias secuencias aminoacídicas de la nucleoproteína almacenadas en la base de datos, por ejemplo la de la cepa CVS (ALG03758.1).

Los clones recombinantes de *E. coli* conteniendo el gen de la nucleoproteína, fueron sometidos a un ensayo de expresión en pequeña escala. Para ello, se realizaron cultivos y se seleccionó el clon con mayor nivel de expresión. Con el clon seleccionado, se realizó un ensayo para determinar la concentración de inductor a utilizar y el tiempo de inducción (Figura 20).

Utilizando las condiciones que mayor nivel de nucleoproteína produjo en erlenmeyer (IPTG 1 mM y 3 horas de inducción), se realizó el escalado en el fermentador.

El diseño del cultivo Batch fue muy simple, solamente fijando los parámetros de pH y agitación de manera de garantizar una buena transferencia de oxígeno, asegurando que el oxígeno disuelto no sea inferior al 30 % del valor de saturación en el medio de cultivo durante todo el proceso. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, fue inducido durante 3 horas, logrando aumentar considerablemente la expresión de la nucleoproteína fusionada al *tag* de histidina. Sin embargo, el nivel de expresión logrado fue menor al esperado. Estudios futuros se centrarán en aumentar dicho nivel. Con tal objetivo, se prevé la utilización de un medio sintético previamente utilizado por el grupo de trabajo con resultados satisfactorios, e ir modificando las condiciones de crecimiento y nutrientes mediante un ensayo

de tipo factorial para lograr el mejor rendimiento posible. Además, se reintentará expresar la nucleoproteína en un sistema de expresión basado en levadura, como *P. pastoris* o *Kluyveromyces lactis*.

Una vez obtenido el lisado celular, se llevó a cabo la purificación de la nucleoproteína fusionada al *tag* de histidina (N-His) mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos, en la que se usó una resina conteniendo adsorbido iones de níquel. Se purificó el extracto crudo en alícuotas y se obtuvo un producto con una pureza de 75 %. Si bien es un buen resultado para un único paso de purificación, el rendimiento obtenido fue menor de lo esperado. Para intentar mejorarlo, se estudiará el efecto de otros metales ligados a la resina, por ejemplo el cobre. Además, se probarán otros buffers de pegado y elución de la resina.

La glicoproteína viral tiene 505 aminoácidos y un peso aproximado de 60 kDa. Esta proteína de membrana de tipo I presenta un ectodominio que se extiende hacia afuera de la superficie de las partículas virales maduras y es inmunológicamente la proteína más importante del virus de la rabia. Induce la respuesta inmune humoral en el huésped luego de la infección siendo el blanco principal de los anticuerpos producidos así como de los linfocitos citotóxicos y helpers específicos (Celis y col., 1988; Macfarlan y col., 1986).

La nucleoproteína viral está compuesta por 450 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 51 kDa. Presenta la secuencia de aminoácidos más conservada entre las proteínas de los lyssavirus (Marston y col., 2007), debido a las regiones que interactúan específicamente con el ARN viral.

Inmunológicamente, la nucleoproteína genera inmunidad contra un desafío de virus rábico en animales (Dietzschold y col., 1987), siendo el principal objetivo para linfocitos T-helpers (Celis y col., 1988). Además, funciona como superantígeno exógeno (Lafon y col., 1992).

Las características mencionadas anteriormente, hicieron de la glicoproteína y nucleoproteína del virus de la rabia las candidatas elegidas para producirlas de manera recombinante y evaluar la utilidad de las mismas como antígenos en una vacuna a subunidades.

Según la bibliografía, para que la glicoproteína induzca la producción de anticuerpos capaces de proteger ante la exposición al virus rábico es necesario que se encuentre correctamente glicosilada (Morimoto y col., 2000). Esta característica, hizo que al momento de escoger un organismo para producirla se opte por uno que presente la maquinaria de enzimas capaces de realizar este tipo de modificación post traduccional.

La levadura *P. pastoris* es una buena alternativa para la expresión de proteínas foráneas ya que es capaz de realizar modificaciones post traduccionales a nivel del procesamiento proteolítico, como la glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Además, permite controlar la expresión del gen de interés por medio del promotor de uno de los genes de la enzima alcohol-oxidasa, que cataliza la primera reacción de la ruta de degradación del metanol en el peroxisoma de la célula. La enzima alcohol-oxidasa tiene poca afinidad por el metanol, pero esto es compensado por la levadura sintetizando grandes cantidades de ella, codificada por dos genes (*aox1* y

aox2). El producto del primero representa más del 90% de la actividad total y su promotor está fuertemente regulado e inducido por la presencia de metanol. Las proteínas expresadas bajo el control de este promotor pueden llegar a niveles superiores al 5% de la proteína total soluble luego de la inducción con metanol. Por lo tanto, este promotor permite una expresión controlada de genes heterólogos y la posibilidad de cultivar la levadura recombinante durante la mayor parte del tiempo en una fuente de carbono no inductora como la glucosa o el glicerol hasta alcanzar una gran densidad celular. Además, debido a la secuencia de secreción del factor α , se obtienen altos niveles de secreción de las proteínas de interés con escasa secreción de proteínas nativas, facilitando el proceso de purificación. Estas características, han convertido *P. pastoris* en un sistema de expresión de proteínas heterólogas ampliamente utilizado, fácilmente escalable y de bajo costo.

El gen que codifica para la glicoproteína de la rabia fue clonado en la levadura *P. pastoris* mediante técnicas de biología molecular. Al analizar la secuencia nucleotídica obtenida (Figura 29), se demostró que el gen de la glicoproteína se encuentra en marco de lectura con la secuencia del factor α y bajo el control del promotor de la enzima alcohol-oxidasa. Al realizar un lineamiento local de la secuencia del gen clonado, se obtuvo más de un 99% de identidad con las secuencias de glicoproteína de las cepas virales fijas Pitman Moore (AJ871962) y CVS-11 (GQ918139.1), mostrando cuatro diferencias puntuales en la secuencia nucleotídica. Por su parte, la secuencia

de aminoácidos de la proteína recombinante (Figura 30), deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida, presentó más de un 99 % de identidad al ser comparada con la secuencia de la glicoproteína de la cepa CVS (BAN66661.1). Cabe resaltar que las cuatro diferencias puntuales en la secuencia nucleotídica no afectaron ninguno de los sitios de N-glicosilación descritos por Wiktor (Wiktor y col., 1973). Estos sitios son esenciales para la glicosilación de la proteína y se encuentran conservados.

Con los clones recombinantes de *P. pastoris* conteniendo el gen de la glicoproteína, se realizaron cultivos en pequeña escala y se seleccionó el clon con mayor nivel de expresión para realizar un ensayo de escalado en fermentador, con el objetivo de aumentar la expresión y producir la proteína recombinante en mayor cantidad.

Cuando se utiliza *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas, la concentración de oxígeno disuelto y metanol en el medio de cultivo durante la alimentación son los parámetros más importantes para lograr una expresión eficiente de proteínas (Hollenberg y Gellissen, 1997). Las cepas Mut⁺ de *P. pastoris* son sensibles a altas concentraciones residuales de metanol (Couderc y Barratti, 1980). Cuando hay falta de oxígeno y exceso de metanol, el formaldehído, el primer producto del metabolismo del metanol, aumenta a niveles tóxicos debido a su acumulación como producto de la oxidación incompleta del metanol (Couderc y Barratti, 1980; Swartz y Cooney, 1981; Hazeu y Donker, 1983; Gleeson y Sudbery, 1988). Por lo tanto, para lograr un crecimiento celular y expresión de proteínas adecuados,

utilizando cepas Mut⁺ de *P. pastoris*, es crítico mantener una baja concentración de metanol en el biorreactor. La ventaja de las cepas Mut⁺, en relación con cepas defectuosas de AOX, es su mayor velocidad de crecimiento utilizando metanol como fuente de carbono y energía. Con el fin de disminuir la degradación proteolítica, mejorar la expresión de la glicoproteína y evitar la fermentación anaeróbica, se utilizó una estrategia de alimentación DO-stat, para asegurar una concentración mínima de metanol y un nivel adecuado de oxígeno. Bajo estas condiciones controladas, se realizaron cultivos de alta densidad.

Al analizar mediante SDS-PAGE, pudo observarse una banda intensa a las 48 horas de inducción de 65 kDa en el sobrenadante de cultivo del clon recombinante no presente en el control negativo (Figura 33A). Este resultado es acorde a lo esperado, debido a que la glicoproteína G de la rabia tiene un peso aproximado de 56,8 KDa sin glicosilar y 65-70 KDa glicosilada (Conzelmann y col., 1990). Cuando se evaluó mediante western blot, la glicoproteína recombinante producida fue reconocida por anticuerpos específicos contra la rabia de la misma manera que la glicoproteína nativa (Figura 33B). A pesar de que *P. pastoris* tuvo la capacidad de glicosilar proteínas de manera similar a la de los organismos eucariotas superiores, se observó una ligera variación en el peso molecular de la proteína obtenida respecto a la glicoproteína del virus, posiblemente debido al agregado en defecto de residuos de azúcares durante el proceso de glicosilación (Figura 33B). Esto puede explicarse por el hecho de que no todas las cepas de *P.*

pastoris presentan las mismas características para glicosilar, teniendo algunas la actividad de glicosilación muy desarrollada y otras no tanto. De todos modos, se realizó un ensayo con la enzima Endo-H para eliminar los residuos glicanos agregados y demostrar que la glicosilación se había llevado a cabo (Figura 33C). El hecho de que se haya demostrado la glicosilación de la proteína por parte de *P. pastoris* no implica que la levadura es capaz de emular íntegramente a las glicosilación de mamíferos y otorgar la inmunidad protectora que se busca. Para ello era necesario hacer un ensayo de inmunización y desafío contra el virus de la rabia.

La composición del medio de cultivo y la estrategia de inducción empleada permitieron expresar 5 mg/l y 10 mg/l de la glicoproteína recombinante a las 24 y 48 horas de alimentación con metanol, respectivamente. Por otro lado, no se observó degradación proteolítica las 48 horas, sino la duplicación en el nivel de expresión. Este período de inducción, es ampliamente inferior al descrito por otros investigadores en un trabajo similar (Nagesha y col., 2010), quienes expresaron la glicoproteína recombinante sólo después de 108 horas de alimentación con metanol en la misma levadura. Esta disminución de tiempo permite un ahorro económico considerable, si se piensa en la posibilidad de escalar este proceso a nivel industrial. Además, estos mismos investigadores describieron la proteólisis total de la glicoproteína formada luego de 12 horas. Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las principales causas de la proteólisis en *P. pastoris* es acumulación de metanol en un ambiente sin oxígeno. Utilizando la

estrategia de alimentación DO-stat desarrollada, podría evitarse tal degradación.

En otro trabajo similar, no se describe la degradación proteolítica de la glicoproteína recombinante. Sin embargo, el nivel de expresión fue 7 veces menor que el reportado aquí (Ben Azoun y col., 2016).

Durante el crecimiento de un microorganismo en un fermentador, a medida que se aumenta la agitación se produce una mayor disolución del oxígeno que ingresa en el vaso. Existe un límite en el aumento de la agitación y está dado por el máximo que pueden soportar las células que están creciendo antes de detener su crecimiento por estrés (o estallar), debido a la intensidad en la fuerza de corte por el movimiento mecánico de las paletas. En los cultivos de alta densidad celular de *P. pastoris*, es relativamente común que se produzca la limitación de la transferencia de oxígeno, debido a que la gran cantidad de células generadas necesitan un mayor nivel de oxígeno que el que puede administrar el fermentador. Mediante la estrategia de alimentación DO-stat utilizada, se maximizó la tasa de alimentación de metanol regulando el nivel de oxígeno disuelto en torno al 40 % del valor de saturación sin necesidad de suministrar oxígeno puro, ni elevar mucho la agitación. De esta manera, se pudo realizar un cultivo de alta densidad celular, aumentando considerablemente la expresión de la proteína recombinante, evitando la limitación en la transferencia de oxígeno y la acumulación de niveles tóxicos de metanol. En conclusión, el método DO-stat desarrollado en este estudio

podría ser eficaz como un método para la alimentación del sustrato en cultivos de alta densidad celular.

Los resultados obtenidos del crecimiento en el fermentador muestran que, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, se puede lograr una expresión adecuada de la glicoproteína del virus de la rabia luego de un corto tiempo de inducción y sin degradación proteolítica. Esta estrategia permite la reducción del tiempo de cultivo, minimizando el costo de producción, que es importante para las aplicaciones industriales.

Estudios a futuro se basarán en la optimización del bioproceso con el objetivo de aumentar el nivel de expresión de la glicoproteína. Debido a que no se ha observado degradación proteolítica, el enfoque inicial estará en ensayar con tiempos de inducción más largos. De todos modos, si con el aumento del tiempo de inducción se observa degradación proteolítica, se plantea la alternativa de administrar oxígeno puro o realizar cultivos en los que el metanol sea agregado de manera exponencial.

Como la glicoproteína fue clonada río debajo de la secuencia del factor α , esta fue secretada al medio extracelular. Este aspecto resultó fundamental debido a que se simplificó mucho la purificación de la proteína recombinante, que se llevó a cabo mediante un paso de cromatografía de intercambio aniónico. Si bien, por cuestiones de tiempo, fue una purificación parcial en la que aún quedaron restos de proteínas extracelulares propias de la levadura, fue suficiente para el estudio de desafío que se llevó a cabo posteriormente. Como trabajo a futuro, se intensificarán los estudios en el proceso de la

purificación con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes y lograr un producto de una pureza elevada. A futuro también, se prevé la utilización de una resina de intercambio catiónico y/o una resina de afinidad por glicoproteínas.

Al realizar el ensayo de potencia de las formulaciones diseñadas, no se generó protección en los ratones con ninguna de las formulaciones utilizadas. Asimismo, no se observó variación en el día de la muerte de los animales inmunizados respecto al grupo control sin vacunar. Este resultado, pudo deberse fundamentalmente a: que las proteínas recombinantes producidas no eran antigénicas, a que se administró escasa cantidad de proteínas recombinantes, a que no se escogió el adyuvante adecuado, o a una combinación de ellas.

A continuación, se realizó un ensayo para determinar si las proteínas recombinantes producidas eran antigénicas y demostrar si eran capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos contra las proteínas virales nativas. Para ello, se inocularon ratones con las proteínas recombinantes en diferentes vías (intramuscular, subcutánea e intraperitoneal) y se utilizaron los sueros obtenidos para un ensayo de western blot contra las proteínas nativas del virus. De esta manera, pudo determinarse que las proteínas recombinantes estimularon la producción de anticuerpos específicos contra las proteínas virales nativas, aunque el nivel logrado fue inferior al alcanzado por uno de los ratones inmunizado con la vacuna de referencia, que había sobrevivido al ensayo de desafío (Figura 35).

Este resultado logrado es alentador, debido a que, sabiendo que las proteínas recombinantes inducen la producción de anticuerpos específicos contra el virus de la rabia, pueden modificarse las condiciones de manera de potenciar la respuesta inmune, alcanzando niveles de anticuerpos que sean neutralizantes ante una descarga viral. Para lograrlo, se ensayarán mayores concentraciones de antígenos y diferentes adyuvantes.

Según la bibliografía, los antígenos solubles puros, recombinantes o sintéticos, han resultado seguros, pero con una menor inmunogenicidad en comparación con aquellos del organismo de origen (Minke y col., 2004), por lo cual es necesaria la utilización de adyuvantes. Los mecanismos de adyuvancia acrecientan la eficacia de muchas vacunas y desempeñan un rol en la determinación del tipo de respuesta inmune (Morris Quevedo y col, 1999; Virelizier, 2009). Estos mecanismos aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados.

En el presente trabajo, se utilizó como adyuvante el hidróxido de aluminio. Este pertenece a la familia de los adyuvantes basados en sales de aluminio y los motivos que llevaron a su elección son: es el tipo de adyuvante más utilizado y es considerado seguro; presenta una morfología en fibras que proporciona una gran superficie sobre la cual pueden adsorberse los antígenos; se disuelve bien en pH ácido y básico pero no en el pH 7,4 del espacio intersticial, permitiendo la liberación lenta de los antígenos. Sin embargo, en la bibliografía existen trabajos que los describen como adyuvantes débiles y muy poco consistentes en su capacidad de estimular

respuestas inmunes mediadas por células (Butler y col., 1969; Schirmbeck y col., 1994; Gupta y col., 1995; Aimanian V y col., 2009). Puede ser que este sea uno de los factores que haya generado que la respuesta inmune no sea acorde a la esperada.

El hecho de que las proteínas recombinantes hayan generado anticuerpos que reconocen específicamente a las dos proteínas virales nativas, es motivador para realizar nuevos estudios a futuro. En ese sentido, se plantea la realización de otro ensayo de inmunización preliminar en el que se utilizará la vía de inoculación intraperitoneal (ya que es la que mayor título de anticuerpos alcanzó), incrementando las cantidades de proteínas recombinantes en la formulación. Se prevé la utilización de diversos adyuvantes que mejorarían la presentación antigénica, y ayudarían a incrementar la respuesta inmune respecto de la obtenida con hidróxido de aluminio. El objetivo es incrementar la producción de anticuerpos contra las proteínas nativas virales, respecto al logrado en este trabajo. Idealmente, se quiere alcanzar niveles similares al alcanzado por la vacuna de referencia, de manera de intentar nuevamente un ensayo de desafío viral.

Como alternativas al hidróxido de aluminio, se plantean los adyuvantes Specol, Montanide ISA 206 (Seppic), y sistemas sintéticos o inactivados de suministro de Ag.

El Specol es una emulsión de aceite mineral suave del tipo agua en aceite (Stills, 2005), que se puede utilizar para los Ag de baja inmunogenicidad y se puede administrar con la misma eficacia por vía SC o IP. Las lesiones

producidas en células y tejidos son menores que las producidas por el adyuvante de Freund completo.

El Montanide ISA 206 es un aceite mineral que contiene ésteres del ácido octadecenoico y anhidromanitol, cuya formulación es agua en aceite en agua (Barnett y col., 1996). Estas emulsiones tienen una baja viscosidad y la habilidad de aumentar la respuesta inmune a corto y largo plazo, y generalmente inducen inmunidad humoral. El Ag en la fase acuosa externa es accesible inmediatamente al sistema inmune como las formulaciones acuosas, y el Ag en la fase acuosa interna es liberado lentamente como las emulsiones agua en aceite.

La última alternativa considerada son los sistemas sintéticos o inactivados de suministro de Ag, dentro de los cuales los más conocidos son los ISCOMs (formados por vesículas lipídicas creadas a partir de colesterol, fosfolípidos y un compuesto glucosídico denominado QuilA que actúa como adyuvante) (Hu y col., 2001).

En el ensayo de desafío viral y determinación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes, la máxima cantidad de proteína inoculada fue de 5 µg por dosis por proteína. Según la bibliografía consultada (Harlow y Lane, 1988), el rango de proteínas solubles por inoculación de ratones via intraperitoneal, capaz de inducir una fuerte respuesta humoral, está en el rango de 5 a 50 µg por dosis por proteína. Por lo tanto, se cree que aumentando las cantidades de proteínas inoculadas, se podría aumentar el título de anticuerpos anti rabia producido.

Teniendo en cuenta que la rabia es una enfermedad que afecta principalmente a los países en desarrollo, es deseable una solución eficiente y económica. Por tal motivo, resulta útil el seguir intentando avanzar en este trabajo para ver si se puede lograr el desarrollo de una vacuna a subunidad para poder controlar la presencia del virus en las zonas afectadas.

6. BIBLIOGRAFIA

Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri S, Bayry J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(6):287-95.

Albertini A, Baquero E, Ferlin A, Gaudin Y. Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses.* 2012;4(1):117-39.

Alexander B. En; Wherein madness, melancholy, and hydrophobia, are treated. The seats and causes of diseases investigated by anatomy (vol. 1). 1960. New York; Hafner Publishing Co.

Ameyama S, Toriumi H, Takahashi T, Shimura Y, Nakahara T, Honda Y. Monoclonal antibody ;3-9-16 recognizes one of the two isoforms of rabies virus matrix protein that exposes its N-terminus on the virion surface. *Microbiology Immunology.* 2003;47(9):639-51.

Anderson L, Nicholson K, Tauxe R, Winkler W. Human rabies in the United States, 1960 to 1979; Epidemiology, diagnosis, and prevention. *Annals of Internal Medicine.* 1984;100:728-35.

Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology.* 2001;75:8096-104.

Baer G, Abelseth M, Debbie J. Oral vaccination of foxes against rabies. *American Journal of Epidemiology.* 1971;93(6): 487-90.

Baer G, Shanthaveerappa T, Bourne G. Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats. *Bulletin of the World Health Organization.* 1965;33:783-94.

Baer G, Shanthaveerappa T, Bourne G. The pathogenesis of street rabies virus in rats. *Bulletin of the World Health Organization.* 1968;38:119-25.

Barbour A, Pugliese A. Convergence of a structured metapopulation model to Levins's model. *Journal of Mathematical Biology.* 2004;49:468-500.

- Barnett P, Pullen L, Williams L, Doel T. International Bank for Foot-and-mouth Disease Vaccine; Assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, Two Commercially Available Oil Adjuvants. *Vaccine*. 1996;14:1187-98.
- Barr J, Whelan S, Wertz G. Cis-acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *Journal of Virology*. 1997;71(11):8718-25.
- Ben Azoun S, Ben Zakour M, Sghaier S, Kallel H. Expression of rabies virus glycoprotein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*. 2017;64(1):50-61.
- Birnboim H, Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-22.
- Blasdell K, Guzman H, Widen S, Firth C, Wood T, Holmes E, Tesh R, Vasilakis N, Walker P. Ledantevirus; a proposed new genus in the Rhabdoviridae has a strong ecological association with bats. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(2):405-10.
- Blumberg B, Giorgi C, Kolakofsky D. N-Protein of vesicular stomatitis-virus selectively encapsidates leader Rna invitro. *Cell*. 1983;32(2):559-67.
- Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *The Journal of General Virology*. 1999;80(10),2545-57.
- Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*. 1993;194:70-81.
- Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*. 1993;194(1):70-81.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Broughan J, Wunner W. Characterization of protein involvement in rabies virus binding to bhk-21-cells. *Archives of Virology*. 1995;140(1):75-93.

Butler N, Voyce M, Burland W, Hilton M. Advantages of aluminum hydroxide adsorbed diphtheria, tetanus and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J*. 1969;1:663-6.

Carolina Piñero C, Gury Dohmen F, Beltran F, Martinez L, Novaro L, Russo S, Palacios G, Cisterna D. High Diversity of Rabies Viruses Associated with Insectivorous Bats in Argentina; Presence of Several Independent Enzootics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1635.

Celis E, Karr R, Dietzschold B, Wunner W, Koprowski H. Genetic restriction and fine specificity of human T cell clones reactive with rabies virus. *Journal of Immunology*, 1988;141(8):2721-8.

Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. In vivo interaction of rabies virus Phosphoprotein (P) and Nucleoprotein (N) - Existence of 2 N-Binding Sites on P-Protein. *Journal of General Virology*. 1994;75:2889-96.

Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(6):427-39.

Conti C, Hauteceur B, Morelec M, Bizzini B, Orsi N, Tsiang H. Inhibition of rabies virus-infection by a soluble membrane-fraction from the rat central nervous-system. *Archives of Virology*. 1988;98(1-2):73-86.

Contreras MA, Eastwood G, Guzman H, Popov V, Savit C, Uribe S, Kramer LD, Wood TG, Widen SG, Fish D, Tesh RB, Vasilakis N, Walker PJ. Almendravirus; A Proposed New Genus of Rhabdoviruses Isolated from Mosquitoes in Tropical Regions of the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(1):100-109.

Conzelmann K, Cox J, Schneider L, Thiel H. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*. 1990;175(2):485-99.

Couderc R, Barratti J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*; purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem*. 1980;44(11):2279-89.

Davies MC, Englert ME, Sharpless GR, Cabasso VJ. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology*. 1963;21:642-51.

Dietzgen RG, Callaghan B, Wetzel T, Dale JL. Completion of the genome sequence of Lettuce necrotic yellows virus, type species of the genus Cytorhabdovirus. *Virus Res.* 2006;118(1-2):16-22.

Dietzgen RG, Kuhn JH, Clawson AN, Freitas-Astúa J, Goodin MM, Kitajima EW, Kondo H, Wetzel T, Whitfield AE. Dichorhavirus; a proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. *Arch Virol.* 2014;159(3):607-19.

Dietzschold B, Lafon M, Wang H, Otvos L, Celis E, Wunner Wal. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Research.* 1987;8(2):103-25.

Dietzschold B, Wang H, Rupprecht C, Celis E, Tollis M, Ertl H. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1987;84(24):9165-9.

DiVestea A, Zagari G. Sur la transmission de la rage par voie nerveuse. *Annales de L'Institut Pasteur (Paris).* 1889;3:237-48.

Dworkin J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2015;24:47-52.

Faber M, Pulmanusahakul R, Nagao K, Prosnjak M, Rice A, Koprowski H. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(46):16328-32.

Feder H, Petersen B, Robertson K, Rupprecht C. Rabies; Still a uniformly fatal disease? Historical occurrence, epidemiological trends, and paradigm shifts. *Current Infectious Diseases Report.* 2012;14:408-22.

Fekadu M. Atypical rabies in dogs in Ethiopia. *Ethiopian Medical Journal.* 1972;10:79-86.

Finke S, Brzozka K, Conzelmann K. Tracking fluorescence-labeled rabies virus; Enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles. *Journal of Virology.* 2004;78(22):12333-43.

- Finke S, Conzelmann K. Virus promoters determine interference by defective RNAs; Selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copyback ambisense rabies virus. *Journal of Virology*. 1999;73(5):3818-25.
- Finke S, Cox J, Conzelmann K. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions; Generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. *Journal of Virology*. 2000;74(16):7261-69.
- Finke S, Granzow H, Hurst J, Pollin R, Mettenleiter T. Intergenotypic replacement of lyssavirus matrix proteins demonstrates the role of lyssavirus M proteins in intracellular virus accumulation. *Journal of Virology*. 2010;84(4):1816-27.
- Finke S, Mueller-Waldeck R, Conzelmann K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *Journal of General Virology*, 2003;84:1613-21.
- Flamand A, Delagneau J. Transcriptional mapping of rabies virus in vivo. *Journal of Virology*. 1978;28(2):518-23.
- Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok R. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*. 1993;194(1):302-13.
- Flamand A, Wiktor T, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal-anti-bodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. 1. The Nucleocapsid Protein. *Journal of General Virology*. 1980;48:97-104.
- Flamand A, Wiktor T, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal-anti-bodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus Proteins. 2. The Glycoprotein. *Journal of General Virology*. 1980;48:105-9.
- Fleming G. Rabies and hydrophobia; Their history, nature, causes, symptoms, and prevention. London; Chapman and Hall. 1872.
- Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto P. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine*. 2014;32:2799-2804.

- Fooks A, McElhinney L, Pounder D, Finnegan C, Mansfield K, Johnson N. Case report; Isolation of a European bat lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis. *Journal of Medical Virology*. 2003;71:281-9.
- Freuling C, Beer M, Conraths F, Finke S, Hoffmann B, Keller B, Kliemt J, Mettenleiter T, Mühlbach E, Teifke J, Wohlsein P, Müller T. Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1519-22.
- Freuling C, Beer M, Conraths F, Finke S, Hoffmann B, Keller B. Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17:1519-22.
- Fu Z, Zheng Y, Wunner W, Koprowski H, Dietzschold B. Both the N-Terminal and the C-Terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. *Virology*. 1994;200(2):590-97.
- Galtier V. Étude sur la rage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*. 1879;89:444-6.
- Gaudin Y, Ruigrok R, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*. 1992;187(2):627-32.
- Ge P, Tsao J, Schein S, Green T, Luo M, Zhou Z. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*. 2010;327(5966):689-93.
- Gigant B, Iseni F, Gaudin Y, Knossow M, Blondel D. Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization. *Journal of General Virology*. 2000;81:1757-61.
- Gleeson M, Sudbery P. The methylotrophic yeasts. *Yeast*. 1988;4(1):1-15.
- Goldwasser R, Kissling R. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1958;98:219-23.
- Goodpasture E. A study of rabies, with reference to a neural transmission of the virus in rabbits, and the structure and significance of Negri bodies. *American Journal of Pathology*. 1925;1:547-84.

Goto H, Minamoto N, Ito H, Luo TR, Sugiyama M, Kinjo T, Kawai A. Expression of the nucleoprotein of rabies virus in *Escherichia coli* and mapping of antigenic sites. *Arch Virol*. 1995;140(6):1061-74.

Greenfield E. *Antibodies. A laboratory manual*. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2014

Gubala A, Walsh S, McAllister J, Weir R, Davis S, Melville L, Mitchell I, Bulach D, Gauci P, Skvortsov A, Boyle D. Identification of very small open reading frames in the genomes of Holmes Jungle virus, Ord River virus, and Wongabel virus of the genus Hapavirus, family Rhabdoviridae. *Evol Bioinform Online*. 2017;13;1176934317713484.

Guichard P, Krell T, Chevalier M, Vaysse C, Adam O, Ronzon F, Marco S. Three dimensional morphology of rabies virus studied by cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology*. 2011;176(1):32–40.

Gupta A, Blondel D, Choudhary S, Banerjee AK. The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *Journal of Virology*. 2000;74(1):91-8.

Gupta R, Rost B, Relyveld E, Siber G. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. En; Powell MF, Newman MJ. *Vaccine design; the subunit and adjuvant approach*. New York, USA, Plenum Press, 1995, 229-48.

Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4);e0003709.

Hansen A, Chaerkady R, Sharma J, Díaz-Mejía J, Tyagi N, Renuse S, Jacob H, Pinto S, Sahasrabuddhe N, Kim M, Delanghe B, Srinivasan N, Emili A, Kaper J, Pandey A. The *Escherichia coli* phosphotyrosine proteome relates to core pathways and virulence. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):1003403.

Harlow E, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual*. 1^o Ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988

- Hazeu W, Donker R. A continuous culture study of methanol and formate utilization by the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 1983;5(6):399-404.
- Henderson H, Jackson F, Bean K, Panasuk B, Niezgoda M, Slate D. Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine. *Vaccine.* 2009;27(51):7194-7.
- Hollenberg C, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(5):554-60.
- Holloway B, Obijeski J. Rabies virus-induced RNA-synthesis in bhk-21- Cells. *Journal of General Virology.* 1980;49:181-95.
- Hu K, Lövgren-Bengtsson K, Morein B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;51(1-3):149-59.
- Hummeler K, Koprowski H, Wiktor T J. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *Journal of Virological.* 1967;1(1);152-70.
- Hunter J. Observations and heads of inquiry on canine madness. *Transactions of a Society for the Improvement of Medical and Chirurgical Knowledge.* 1793;1:294-329.
- Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the care and use of Laboratory Animals Washington, D.C; National Research Council. National Academy Press: 1996.
- Invitrogen Corporation. *Pichia Expression Kit; A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris*: 2002.
- Iseni F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok R. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *The Journal of General Virology.* 1998(12);79:2909-19.
- Ito N, Takayama M, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene; Glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *Journal of Virology.* 2001;75(19):9121-8.

Ito Y, Nishizono A, Mannen K, Hiramatsu K, Mifune K. Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. *Archives of Virology*. 1996;141(3-4):671-83.

Jackson A. *Babies: Scientific Basis of the Disease and Its Management*. 3rd ed. New York; Elsevier Science Publishing Co Inc: 2013.

Jackson A. Therapy of human rabies. *Adv Virus Res*. 2011;79:365-75.

Jackson AO, Li Z. Developments in Plant Negative-Strand RNA Virus Reverse Genetics. *Annu Rev Phytopathol*. 2016;54:469-98.

Johnson R. Experimental rabies; studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1965;24:662-74.

Kell AM, Wargo AR, Kurath G. The role of virulence in vivo superinfection fitness of the vertebrate RNA virus infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol*. 2013;87(14):8145-57.

Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. 1995;209(2):526-37.

Kristensson K, Dastur D, Manghani D, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies; interactions between neurons and viruses; a review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1996;22:179-87.

Kristensson K, Dastur D, Manghani D, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies; Interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1996;22(3):179-87.

Kuzmin I, Hughes G, Rupprecht C. Phylogenetic relationships of seven previously unclassified viruses within the family Rhabdoviridae using partial nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology*. 2006;87:2323-31.

Kuzmin I, Mayer A, Niezgoda M, Markotter W, Agwanda B, Breiman R. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Research*. 2010;149:197-210.

- Kuzmin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE. The rhabdoviruses; biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):541-53.
- Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacterio-phage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Scott-Igara D. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature.* 1992;358(6386):507-10.
- Lafon M. Rabies virus receptors. *Journal of Neurovirology.* 2005;11(1):82-7.
- Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, Blondel D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells; Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *Journal of Virology.* 2009;83(16):7948-58.
- Langevin C, Tuffereau C. Mutations conferring resistance to neutralization by a soluble form of the neurotrophin receptor (p75NTR) map outside of the known antigenic sites of the rabies virus glycoprotein. *Journal of Virology.* 2002;76(21):10756-65.
- Le Blanc I, Luyet P, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, Gruenberg J. Endosome to cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nature Cell Biology.* 2005;7(7):653-64.
- Lee S. High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* 1996;14(3):98-105.
- Letchworth J, Rodriguez L, Del cbarrera J. Vesicular stomatitis. *Vet J.* 1999;157(3):239-60.
- Lewis P, Fu Y, Lentz T. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle and Nerve.* 2000;23(5):720-30.
- Lij J, Rahmeh A, Morelli M, Whelan S. A conserved motif in region V of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *Journal of Virology.* 2008;82(2):775-84.
- Liu P, Yang J, Wu X, Fu Z. Interactions amongst rabies virus nucleoprotein, phosphoprotein and genomic RNA in virus-infected and transfected cells. *The Journal of General Virology.* 2004;85(12):3725-34.
- Longdon B, Day J, Schulz N, Leftwich P, de Jong M, Breuker C, Gibbs M, Obbard D, Wilfert L, Smith S, McGonigle J, Houslay T, Wright L, Livraghi L, Evans L, Friend L, Chapman T,

Vontas J, Kambouraki N, Jiggins F. Vertically transmitted rhabdoviruses are found across three insect families and have dynamic interactions with their hosts. *Proc Biol Sci*. 2017;284(1847).

Macek B, Mijakovic I, Olsen J, Gnad F, Kumar C, Jensen P, Mann M. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(4):697-707.

Macfarlan R, Dietzschold B, Koprowski H. Stimulation of cytotoxic T-Lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Molecular Immunology*. 1986;23(7):733-41.

Magendie F. Expérience sur la rage. *Journal de Physiologie Expérimentale*. 1821;1:40-6.

Manual de normas y procedimientos para la vigilancia, prevención y control de la rabia, Ministerio de Salud de Argentina, 2007.

<http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/manual-rabia.pdf>

Markotter W, Van E, Kuzmin I, Rupprecht C, Paweska J, Swanepoel R. Epidemiology and pathogenicity of African bat lyssaviruses. *Developments in Biologicals*. 2008;131;317-25.

Marston D, Horton D, Ngeleja C, Hampson K, McElhinney L, Banyard A. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18:664-7.

Marston D, McElhinney L, Johnson N, Muller T, Conzelmann K, Tordo N, Fooks A. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *The Journal of General Virology*. 2007;88(4):1302-14.

Matsumoto S. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology*. 1962;17:198-202.

- Mavrakakis M, Iseni F, Mazza C, Schoehn G, Ebel C, Gentzel M, Ruigrok R. Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells. *Virology*. 2003;305(2):406-14.
- McQuiston J, Yager P, Smith J, Rupprecht C. Epidemiologic characteristics of rabies virus variants in dogs and cats in the United States, 1999. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001;218:1939-42.
- Mebatsion T, König M, Conzelmann K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell*. 1996;84(6):941-51.
- Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Journal of Virology*. 1999;73(1):242-50.
- Medeiros DB, Diniz Júnior JA, Cardoso JF, Silva SP, da Silva DE, de Oliveira LF, E Vasconcelos J, Chiang J, Dias A, Nunes M, Vianez Júnior J, Vasconcelos P. Nearly complete genome sequence of curionopolis virus, a culicoides-related rhabdovirus isolated in the Brazilian Amazon region. *Genome Announc*. 2014;13;2(6).
- Minke J, Audonnet J, Fischer L. Equine viral vaccines; the past, present and future. *Vet Res*. 2004;35:424-43.
- Miyamoto K, Matsumoto S. The nature of the Negri body. *Journal of Cell Biology*. 1965;27: 677-82.
- Morimoto K, Foley H, McGettigan J, Schnell M, Dietzschold B. Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *Journal of Neurovirology*. 2000;6(5):373-81.
- Morris Quevedo H, Martinez Manrique C, Abdala Dias R, Campos Orama D. Ayuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1999;18(2):130-7.
- Murphy F, Harrison A, Winn W, Bauer S. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses; infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. *Laboratory Investigation*. 1973;29:1-16.

Nagesha S, Ramanjini Gowda P, Ningaraju T, Madhusudana S, Deepak N, Mahadeva Swamy H, Yogendra K, Nagaraju T, Desai A. Heterologous Expression of CVS Rabies Virus Glycoprotein Gene in *Pichia pastoris*. 2010;1(1): 101-110.

Nakahara T, Toriumi H, Irie T, Takahashi T, Ameyama S, Mizukoshi M, Kawai A. Characterization of a slow-migrating component of the rabies virus matrix protein strongly associated with the viral glycoprotein. *Microbiology Immunology*. 2003;47(12): 977-88.

Nathwani D, McIntyre P, White K, Shearer A, Reynolds N, Walker D. Fatal human rabies caused by European bat Lyssavirus type 2a infection in Scotland. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37:598-601.

Negri A. Beitrag zum studium der aetiologie der tollwuth. *Zeitschrift fur Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1903;43:507-28.

Nettles V, Shaddock J, Sikes R, Reyes C. Rabies in translocated raccoons. *American Journal of Public Health*. 1979;69:601-2.

Pasteur L, Chamberland C, Roux E, Thuillier L. Sur la rage. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1881;92:1259-60.

Pasteur L, Chamberland C, Roux E. Nouvelle communication sur la rage. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1884;98:457-63.

Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1885;101:765-74.

pp. 144-87.

Remlinger P. Le passage du virus rabique à travers les filtres. *Annales de L'Institut Pasteur (Paris)*. 1903;101:765-74.

Ruane NM, Rodger HD, McCarthy LJ, Swords D, Dodge M, Kerr RC, Henshilwood K, Stone DM. Genetic diversity and associated pathology of rhabdovirus infections in farmed and wild perch *Perca fluviatilis* in Ireland. *Dis Aquat Organ*. 2014;112(2);121-30.

- Rupprecht C, Glickman L, Spencer P, Wiktor T. Epidemiology of rabies virus variants. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. *American Journal of Epidemiology*. 1987;126:298-309.
- Sabeta C, Markotter W, Mohale D, Shumba W, Wandeler A, Nel L. Mokola virus in domestic mammals, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13:1371-3.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning; a laboratory manual*. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989
- Sasaya T, Ishikawa K, Kuwata S, Koganezawa H. Molecular analysis of coat protein coding region of tobacco stunt virus shows that it is a strain of Lettuce big-vein virus in the genus *Varicosavirus*. *Arch Virol*. 2005;150(5);1013-21.
- Saxena, S, Sonawane A, Dahiya S, Patel C, Saini M, Rai A, Gupta P. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. *Vet Microbiol*. 2008;136:36-44.
- Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice; implications for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Virol*. 1994;68:1418-25.
- Semple D. The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine. Calcutta; Superintendent Government Printing, India. (Scientific memoirs by officers of the medical and sanitary departments of the government of India. New series, no. 44). 1911.
- Shakin-Eshleman S, Remaley A, Eshleman J, Wunner W, Spitalnik S. N-Linked glycosylation of rabies virus glycoprotein individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell-surface expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(15):10690-8.
- Shwiff S, Hampson K, Anderson A. Potential economic benefits of eliminating canine rabies. *Antiviral Res*. 2013;98(2):352-6.
- Sissoeff L, Mousli M, England P, Tuffereau C. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75(NTR) receptor. *Journal of General Virology*. 2005;86:2543-52.

Smith J. Rabies virus epitopic variation; Use in ecologic studies. *Advances in Virus Research*. 1989;36:215-53.

Sokol F, Clark H, Wiktor T, McFalls M, Bishop D, Obijeski J. Structural phosphoproteins associated with ten rhabdoviruses. *The Journal of General Virology*. 1974;24(3):433-45.

Speare R, Skerratt L, Foster R, Berger L, Hooper P, Lunt R. Australian bat lyssavirus infection in three fruit bats from north Queensland. *Communicable Diseases Intelligence*. 1997;21:117-20.

Steele J. History of rabies. In G. M. Baer (Ed.), *The natural history of rabies*. New York; Academic Press. 1975;1:1-29.

Stills HF. Adjuvants and antibody production; dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J*. 2005;46(3):280-93.

Stone D, Kerr R, Hughes M, Radford A, Darby A. Characterisation of the genomes of four putative vesiculoviruses; tench rhabdovirus, grass carp rhabdovirus, perch rhabdovirus and eel rhabdovirus European X. *Arch Virol*. 2013;158(11):2371-7.

Stremlau M, Andersen K, Folarin O, Grove J, Odia I, Ehiane P, Omoniwa O, Omoregie O, Jiang P, Yozwiak N, Matranga C, Yang X, Gire S, Winnicki S, Tariyal R, Schaffner S, Okokhere P, Okogbenin S, Akpede G, Asogun D, Agbonlahor D, Walker P, Tesh R, Levin J, Garry R, Sabeti P, Happi C. Discovery of novel rhabdoviruses in the blood of healthy individuals from West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003631.

Studier F, Rosenberg A, Dunn J, Dubendorff J. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*. 1990;185:60-89.

Sutcliffe J. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1979;43(1):77-90

Swartz J, Cooney C. Methanol inhibition in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1981;41(5):1206–13.

Thoulouze M, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of Virology*. 1998;72(9):7181-90.

Tiwari S, Roy S, Tuli R, Mishra D, Singh A, Singh P. High level expression of a functionally active cholera toxin B; rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds. *Plant Cell Rep.* 2009;28:1827-36.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination; Highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology.* 1988;165(2):565-76.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome; Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1986;83(11):3914-8.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome; Segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Research.* 1986;14(6):2671-83.

Toriumi H, Kawai A. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol.* 2004;48(5):399-09.

Vasilakis N, Widen S, Mayer S, Seymour R, Wood T, Popov V, Guzman H, Travassos da Rosa A, Ghedin E, Holmes E, Walker P, Tesh R. Niakha virus; a novel member of the family Rhabdoviridae isolated from phlebotomine sandflies in Senegal. *Virology.* 2013;444;80-89.

Virelizier J. Adjuvants and formulations; how to make an immunogen from an antigen. *Biologicals.* 2009;37(3):139-40.

Wagner, R. Rhabdovirus biology and infection; an overview. En; Wagner, R.R. (Ed.), *The Rhabdoviruses*. Plenum Press, NY, EEUU, 2014,pp. 9–74.

Walker PJ, Klement E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res.* 2015;46;124.

Warrel M. Current rabies vaccines and prophylaxis schedules; Preventing rabies before and after exposure. *Travel Med Infect Dis.* 2012;10(1):1-15.

Weyer J, Rupprecht C, Nel L. Poxvirus-vectored vaccines for rabies—a review. *Vaccine*. 2009;27(51): 7198-7201.

Whelan S, Barr J, Wertz G. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Biology of Negative Strand Rna Viruses; The Power of Reverse Genetics*. 2004;283:61–119.

Whitt M, Buonocore L, Prehaud C, Rose J. Membrane-Fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology*. 1991;185(2):681-8.

Wiktor T, György E, Schlumberger D, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol*. 1973;110(1):269-76.

Wilkinson L. The development of the virus concept as reflected in corpora of studies on individual pathogens; rabies two millennia of ideas and conjecture on the etiology of a virus disease. *Medical History*. 1977;21:15-31.

Wright W. *De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione, libri III*. Nueva York, Estados Unidos, 1930, p. 124-33.

Wunner W, Larson J, Dietzschold B, Smith C. *Review of Infectious Diseases* **10**, Supplement 4, S771–S784, 1988.

Wunner W, Dietzschold B, Smith C, Lafon M, Golub E. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology*. 1985;140(1):1-12.

Wunner W, Reagan K, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Journal of Virology*. 1984;50(3):691-7.

Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, Fu Z. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. *Journal of Virological*. 1999;73(2):1661-4.

Yelverton E, Norton S, Obijeski J, Goeddel D. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*. 1983;219(4585):614-20.

Zinke G. *Neue Ansichten der Hundswuth: ihrer Ursachen und Folgen, nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Thieren gebissenen Menschen*. Jena, Germany; Gabler. 1804.